

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО» МОН УКРАЇНИ

Штапенко Оксана Всеволодівна

УДК 602.6:592/599;591.33:57.086.83:577.118

**БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ РЕГУЛЯЦІЇ ГАМЕТОГЕНЕЗУ ДЛЯ
КОРЕКЦІЇ РАННЬОГО ЕМБРІОНАЛЬНОГО РОЗВИТКУ ТВАРИН**

03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Київ-2019

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті біології тварин НААН.

Науковий консультант: доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Матвієнко Наталія Миколаївна,
Інститут рибного господарства НААН,
завідувач відділу іхтіопатології

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України
Стойка Ростислав Стефанович,
Інститут біології клітини НАН України,
завідувач відділу регуляції
проліферації клітин та апоптозу

доктор біологічних наук, професор
Савчук Олексій Миколайович,
Навчально-науковий центр «Інститут біології
та медицини» Київського національного
університету імені Тараса Шевченка,
завідувач кафедри біохімії

доктор біологічних наук, професор
Горго Юрій Павлович,
Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут
імені Ігоря Сікорського» МОН України,
професор кафедри біоінформатики

Захист відбудеться «25» жовтня 2019 р. об 14³⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.002.28 Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» (03056, м. Київ, просп. Перемоги, 37, корпус 4, ауд. 258).

З дисертацією можна ознайомитися у Науково-технічній бібліотеці ім. Г. І. Денисенка Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» за адресою 03056, м. Київ, просп. Перемоги, 37.

Автоферат розіслано «__» вересня 2019 р.

Вчений секретар спеціалізованої
вченої ради



Т. С. Тодосійчук

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Ефективність ведення і рентабельність тваринництва визначається впровадженням сучасних методів репродуктивної біотехнології, які дозволяють істотно збільшити поголів'я, інтенсифікувати селекційний процес, розширити використання генетичного потенціалу високоцінних тварин, прискорити їх розмноження (Бащенко М. І., 2012; Буркат В. П., 2008; Мадіч А. В., 2005; Ковтун С. І., 2012; Шаран М. М., 2017; Яблонський В. А., 2008). Розробка та застосування біотехнологічних методів, що дозволяють підвищити заплідненість самок, отримати максимальну кількість здорового приплоду і зменшити ембріональні втрати, є необхідною умовою реалізації зазначених завдань.

Одним із чинників, який визначає успішність імплантації є якість ооцитів, синхронність їх ядерного і цитоплазматичного дозрівання, що позначається на подальшому розвитку та отриманні ембріонів з високим потенціалом розвитку (Дзіцюк В. В., 2018; Izquierdo D., 2002; Faramarzi A., 2017). Життєздатність ранніх ембріонів залежить від багатьох факторів, зокрема, активування ембріонального геному, зрілості та генетичного статусу, який визначається поєднанням материнського та батьківського геномів (Simon L., 2014; Colaco S., 2018).

До причин ембріональної смертності відносять епігенетичні процеси метилювання ДНК, ремоделювання хроматину, фрагментацію ДНК сперматозоїдів, які допускають запліднення, але викликають ембріональну летальність на ранніх стадіях розвитку (Hunter M. G., 2000; Sedo C. A., 2017). Однак ці механізми порушення імплантації, за винятком генетичної складової, залишаються не з'ясованими і вимагають подальших досліджень.

Незважаючи на розвиток сучасних біотехнологічних методів відтворення тварин, існує необхідність вивчення як питань встановлення та посилення ембріонально-маткової взаємодії, раннього ембріогенезу, зумовленого впливом материнського і батьківського геному, так і розробкою методів активування імплантаційної та ембріональної здатності самиць.

Розвиток зигот і нормальний перебіг вагітності, у значній мірі, залежить від збалансованості гормонального фону в організмі матері та забезпеченні мікронутрієнтами (Милостива Д. Ф., 2014; Суходольська Н. В., 2015; Шеремета В. І., 2015; Себа М. В., 2017; Хоменко М. О., 2017). Інтенсифікація відтворювальної здатності самиць передбачає використання біологічно активних речовин, різноманітних препаратів та біотехнологічних підходів, що сприяють посиленню ендокринного та метаболічного профілів організму й активуванню обмінних процесів у репродуктивних органах. Головна увага в даному напрямку приділяється проблематиці мікроелементозів при вагітності самиць (Яблонський В. А., 2009; Віщур О. І., 2015; Милостива Д. Ф., 2016; Склярів П. М., 2016; Cheng H. H., 2004), тоді як передімплантаційна підготовка залишається поза увагою, хоча саме цей період забезпечує оптимальні умови для дозрівання гамет, визначає успішність імплантації зиготи, стабільність ембріонального геному, розвитку плода.

Поряд зі значними досягненнями репродуктивної біотехнології, актуальним залишається завдання підвищення рівня запліднення та імплантації, що потребує комплексних підходів з урахуванням морфо-фізіологічних, генетичних факторів, а також підготовку організму самиці до вагітності.

Одним із підходів, який дозволяє швидко відпрацювати біотехнологічні методи, проводити скринінгові дослідження, з'ясувати клітинну відповідь на дію окремих чинників, є використання альтернативних досліджень *in vitro* (Трахтенберг І. М., 2010; Дейнека С. Є., 2000). Водночас, важливою умовою для достовірного вивчення особливостей розвитку гамет і перебігу раннього ембріогенезу, встановлення закономірностей генетичних процесів у ссавців є проведення досліджень *in vivo*.

Проведення досліджень на модельних системах *in vitro* та *in vivo* дозволяє встановити розвиток порушень гаметогенезу ссавців на всіх ланках репродуктивної системи за умов дії екзогенних чинників та корегувати виявлені зміни, що було основним напрямком дисертаційної роботи.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано у рамках завдань наукових досліджень Інституту біології тварин НААН у період 2006-2015 рр. за темами: ДР 0106U003052 «Розробити методи стимуляції ембріонально-маткового сигналу у ссавців на основі вивчення механізму його становлення на ранніх стадіях вагітності», ДР 0111U006157 «Вивчити біологічні особливості зниження репродуктивної функції у сільськогосподарських тварин та розробити методи її інтенсифікації», ДР 0111U006154 «Розробити і впровадити методологію росту моношарів культур клітин маткового та ембріонального походження в системі збереження біологічного різноманіття тварин».

Мета і завдання дослідження. *Мета роботи* – розробка та застосування сучасних біотехнологічних підходів регуляції гаметогенезу модельних тварин задля підвищення репродуктивної функції самок, рівня запліднення, імплантаційної здатності та запобігання ранніх ембріональних втрат.

Для досягнення мети у роботі, вирішували наступні *завдання*:

- оптимізувати окремі етапи пронуклеарної мікроін'єкції і надшвидкого кріоконсервування ембріонів ранніх стадій розвитку;
- визначити вплив культуральної системи репродуктивних клітин на морфологічні показники деконсервованих ембріонів;
- розробити об'ємну культуральну систему з використанням природніх і полімерних наноповерхонь і провести скринінг біосумісності цих нанопокриттів на різних типах культур клітин;
- вивчити вплив об'ємної клітинної системи, створеної на природніх та полімерних наносферах, на дозрівання ооцитів і розвиток доімплантаційних ембріонів *in vitro*;
- оцінити вплив сполук різних металів на культурі клітин яйцепроводів та ембріональних фібробластах корів як тест-об'єкту для вивчення відтворювальної здатності самиць за дії факторів довкілля;

- з'ясувати вплив епігенетичних процесів на ранній ембріогенез, як складову чоловічого генетичного чинника, на прикладі аналізу патерну експресії генів у сім'яниках мишей за впливу локальної гіпертермії (42 °С, 30 хв);

- дослідити вплив біогенних мікроелементів (Мангану, Цинку, Хрому) на заплідненість та імплантаційну здатність ембріонів самок лабораторних тварин;

- встановити залежність імплантаційного потенціалу і розвитку ембріонів від мінерального забезпечення самиць у прегравідарний період.

Об'єкт дослідження: регуляція гаметогенезу тварин ендо- та екзогенними чинниками для корекції раннього ембріонального розвитку у прегравідарний період.

Предмет дослідження: адаптивна відповідь клітин, гамет та функціонального стану репродуктивної системи організму тварин на дію різних стресових чинників, показники відтворювальної здатності, заплідненість, стан антиоксидантної системи та біотехнологія інноваційних препаратів для стимуляції відтворювальної здатності самок тварин.

Методи дослідження: культивування *in vitro* перещеплюваних культур клітин, первинних культур клітин репродуктивних органів, ооцитів та ембріонів, кріоконсервування зигот, мікроскопічні, генетичні (полімеразно ланцюгова реакція, клонування), біохімічні (визначення показників антиоксидантної системи, активності ензимів, вмісту ліпідів), гематологічні (визначення показників клінічного аналізу крові), а також статистичний аналіз одержаних результатів.

Наукова новизна одержаних результатів. Удосконалено окремі етапи твердоповерхневої вітрифікації зигот на стадії 2-ох пронуклеусів, оптимізовано технологію пронуклеарної мікроін'єкції, одержано приплід після трансплантації ін'єкованих зигот. Доведено перевагу використання клітинної культури репродуктивних органів самиць для культивування деконсервованих доімплантаційних ембріонів до стадії бластоцисти *in vitro*.

Експериментально доведено доцільність культивування клітин різних типів, дорощування та культивування ооцитів і зигот тварин поза організмом до трансферабельних стадій на просторово-орієнтованих нанопокриттях, створених методом органічного синтезу на матриці біогелю природнього походження і нанопокриттях з АПТЕС (3-амінопропіл(триетокси)силан), декстраном та альбуміном. Вперше встановлено, що модифікація нанопокриття полімерними наношарами декстрану, АПТЕС та альбуміну дозволяє наділити поверхню біологічно активними властивостями та отримати просторово-організовану клітинну систему, що покращує адгезію, стимулює ріст і проліферацію клітин. Створена 3D (тримірна) об'ємна клітинна система на носіях органічної та неорганічної природи здатна виконувати функції специфічного клітинного матриксу та сприяє моделюванню ембріонально-маткової взаємодії між клітинами ендометрію і бластомерами ембріона, що забезпечує стимуляцію і розвиток зигот поза організмом. Розроблено методи

культивування моношарів культур клітин яйцепроводів на нанопокриттях різних типів зі створенням просторово-організованої клітинної системи для підвищення якості ембріонального матеріалу за використання їх у біотехнологічних дослідженнях.

Проведено системне дослідження особливостей гаметогенезу тварин за впливу екзогенних хімічних чинників (Cd, Ni, Cu, Zn, Mn, Cr) та фізичних природних факторів (гіпертермія) *in vitro* та *in vivo*.

Одержано нові дані про молекулярні механізми регуляції сперматогенезу за дії теплового шоку. Встановлено відмінність у відповіді на тепловий шок між соматичними і статевими клітинами та проаналізовано патерн експресії гена *Cideb*, пов'язаного з регуляцією апоптозу, (кодує одноіменний протеїн, який відповідає за регуляцію апоптозу) у тканинах миші за впливу локальної гіпертермії. Вперше виявлено альтернативний сплайсинг-варіант гена *Cideb* у сім'яниках за гіпертермії 42°C, що дозволило розширити уявлення про характер адаптивної відповіді організму, зокрема, репродуктивної функції самців, на дію стресових чинників.

Вперше вивчено вплив глютамату мангану та цинку, хром-метіоніну на культури клітин різних типів як тест-об'єктів для встановлення біохімічної дії та оптимальної дози мікроелементів, з наступним їх впливом на відтворювальну здатність тварин та розробкою і створенням комплексного препарату з органічних сполук металів. Доведено доцільність та обґрунтованість застосування первинних органо-специфічних культур клітин репродуктивних органів для з'ясування безпосереднього впливу ксенобіотиків на репродуктивні клітини та прогнозування ступеню чутливості тканин і репродуктивної здатності тварин.

Уперше досліджено дію глютамату мангану і цинку у формі ліпосомальної емульсії у прегравідарний період. Виявлено доцільність використання цинку глютамату у період перед заплідненням, а в ранній ембріональний період – мангану глютамату.

Практичне значення одержаних результатів. З метою підвищення ефективності методів отримання ембріонів ссавців поза організмом пропонуємо за пронуклеарної мікроін'єкції використовувати культуральні системи клітин репродуктивних органів для дорощування зигот та відновлення деконсервованих ембріонів.

Розроблено та експериментально апробовано препарат «Ліпоорганік», який поєднує у своєму складі фармакологічні властивості органічних і мінеральних біогенних мікроелементів у ліпосомальній формі. Препарат «Ліпоорганік» рекомендується до застосування з метою стимуляції відтворювальної здатності та запліднення самиць за 14 діб до осіменіння. Для посилення репродуктивної функції кролиць у ранній період сукрільності рекомендовано додавати препарат «Ліпоорганік» до складу гранульованого комбікорму за 14 діб до осіменіння, а також у поєднанні зі введенням препарату при осіменінні.

Для оптимізації умов дозрівання та культивування *in vitro* ооцитів та ембріонів рекомендовано застосовувати об'ємні клітинні системи маткового походження на основі нанопокриттів різних типів.

На підставі одержаних результатів розроблено методичні рекомендації «Отримання функціоналізованих наноповерхонь для культивування клітин, ооцит-кумулюсних комплексів та ембріонів тварин».

Розроблений алгоритм системного вивчення токсичності та/або біосумісності сполук металів на органоспецифічних первинних культурах клітин викладено у навчально-методичному посібнику «Клітинні культури і можливості їх використання в ембріональній біотехнології» (Рекомендовано Міністерством освіти і науки, спорту та молоді. Лист МОН спорту та молоді № 1/11 від 13.01.2012 року).

Особистий внесок здобувача. Автор самостійно обґрунтовано тему і концепцію дисертаційної роботи, проведено пошук та аналіз літератури, розроблено схему і методологію експериментальних досліджень, сформульовано основні положення дисертації, проведено статистичний аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, підготовлено до друку публікації за темою роботи. Експерименти виконані дисертанткою особисто або за безпосередньої її участі. Формулювання основних положень, висновків і практичних рекомендацій виконано під керівництвом наукового консультанта д. б. н. Матвієнко Н. М. Планування роботи та обговорення частини отриманих результатів, підготовка деяких рукописів до публікації здійснювались спільно з доктором с.-г. наук Мадіч Аллою Всеволодівною. Синтез, ідентифікацію та характеристику наноповерхонь проведено у Національному університеті «Львівська політехніка» за участі доцента, к. хім. н. Стецишина Ю. Б.

У межах виконання гранту National Cancer Institute (NCI, Bethesda, USA) в Інституті онкології ім. Марії Склодовської-Кюрі (Польща) визначено тканиноспецифічну експресію генів і проведено окремі етапи пронуклеарної мікроін'єкції. Співучасть у роботі закордонних партнерів і співробітників лабораторії біотехнології відтворення Інституту біології тварин НААН вказано у спільних публікаціях.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень, викладені у дисертаційній роботі, доповідались на методичній і Вченій радах Інституту біології тварин НААН (2006-2016 рр.), а також були представлені на міжнародних та українських наукових конференціях і симпозіумах: «Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини» (м. Львів, 2012, 2014, 2016), XIV конгресі Польського біохімічного товариства (Wisla, 2010), XIV Gliwice Scientific Meetings (Gliwice, Poland, 2010), VI Міжнародній конференції молодих вчених «Біорізноманіття. Екологія. Адаптація. Еволюція.» (Одеса, 2013), Міжнародній конференції, приуроченій професору А. К. Тарковському «Mammalian Embryology Conference» (Warsaw, 2013), Міжнародній конференції «Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2013)» (Буковель, 2013), Національній науково-технічній інтернет-конференції з міжнародною участю «Актуальні проблеми синтезу і створення нових

біологічно-активних сполук та фармацевтичних препаратів» (Львів, 2013), IX Міжнародній науковій конференції da Rostim 2013 «Фітогормони, гумінові речовини та інші біологічно активні сполуки для сільського господарства, здоров'я людини і охорони навколишнього середовища» (Львів, 2013), 8-й Міжнародній конференції ECNP «Nanostructured Polymers and Nanocomposites» (Dresden, 2013), Українському біохімічному конгресі (Київ, 2014), 21-й Міжнародній конференції KRMIVA (Opatija Hrvatska, Croatia, 2014), 5-й Міжнародній конференції «Human–Nutrition–Environment» «Biotechnology for sustainable development» (Rzeszów, 2014), Міжнародному науковому симпозиумі «Modern animal husbandry – strategies, opportunities and performances» (Iasi, Romania, 2014), 9-й Міжнародній конференції «Structure and Stability of Biomacromolecules» (SSB 2015) (Kosice, Slovakia, 2015), XII Міжнародній конференції молодих вчених «Physiology and Biochemistry in Animal Nutrition» (Łowicz, Poland, 2015), Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини», присвяченій 55-річчю Інституту біології тварин НААН (Львів, 2015), 20-му Міжнародному симпозиумі «Housing and Diseases of Rabbits, Furproviding Animals and Pet Animals» (Celle, German, 2017), V Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні проблеми біології, екології та хімії» (Запоріжжя, 2017), XXIV симпозиумі по імунології та репродукції з міжнародною участю (The Castle, Trest, Czech Republic, 2018).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 53 наукові праці, у тому числі 1 монографія, 22 статті (18 – у наукових фахових виданнях України з біологічних наук та 4 – у виданнях іноземних держав, які включені до міжнародних наукометричних баз даних), 3 праці у інших виданнях, 5 патентів на корисну модель, 22 тези доповідей у збірниках матеріалів конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, опису результатів власних досліджень, їх аналізу та обговорення, висновків, списку використаної літератури (691 найменувань, в тому числі 421 латиницею) і додатків (13). Дисертацію викладено на 406 сторінках комп'ютерного тексту, її основна частина становить 292 сторінки. Робота ілюстрована 99 таблицями і 49 рисунками, з яких 6 повністю займають площу сторінки.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. У 3-ох розділах огляду літератури проаналізовано наявні у літературі дані стосовно біотехнологічних особливостей відтворювальної здатності тварин за дії зовнішніх чинників як потенційних факторів ризику. Наведено основні відомості про механізми дії цих ксенобіотиків на різних рівнях організації функціональних систем організму та вказано характер патологічних станів організму за їх впливу.

Викладено сучасні дані щодо особливостей епігенетичних модифікацій у гамето- та ембріогенезі за впливу абіотичних чинників Також висвітлено дані

щодо застосування сучасних біотехнологічних методів, зокрема, нанотехнологій, вітрифікації зигот, трансгенезу у репродуктивній біотехнології.

Загальна методика та основні методи досліджень. Дисертаційну роботу виконано впродовж 2006-2015 років в Інституті біології тварин НААН за схемою (рис. 1).

1-й етап досліджень був спрямований на удосконалення окремих методичних підходів ембріональної біотехнології, що дозволяє отримувати достатню кількість ембріонів з високим імплантаційним потенціалом в умовах *in vitro* та сприяє удосконаленню технологічних елементів трансплантації.

Зиготи мишей на стадії 2-ох пронуклеусів отримували від самок гібридної лінії ICR (CD-1) Albino, FVB/N після індукції поліовуляції шляхом внутрішньочеревної ін'єкції 5 МО ГСЖК (PMSG, Biowet, Польща) та 5 МО ХГЛ (Pregnyl, Organon, Польща) з інтервалом введення 48 год. Зиготи вимивали з ампульної ділянки яйцепроводів у середовище М2 ("Sigma", США) з гіалуронідазою (80 МО/мл) через 19-20 год після ін'єкції ХГЛ. Після морфологічної оцінки отримані зиготи мишей на стадії 2-ох пронуклеусів поділяли на 3 групи та заморожували методом твердоповерхневої вітрифікації мікрокрапель як описано Dinnyes et al. (2001). Отримані після вітрифікації ембріони кожної групи – В 1 (використання 40 % ЕГ у вітрифікованому середовищі), В 2 (35% ЕГ+5% ПВП) та В 3 (28 % ЕГ+12 % ДМСО) поділяли на дві підгрупи: дослідну (Д) та контрольну (К). Деконсервовані ембріони дослідної підгрупи співкультивували на моношарі клітин яйцепроводів, а для культивування ембріонів контрольної підгрупи до трансферабельних стадій використовували культуральне середовище ДМЕМ без фідерних клітин.

На 2-му етапі створено та апробовано комплексну просторово організовану клітинну систему на біогелі та різних полімерних наношарах, для дозрівання ооцит-кумулюсних комплексів (ОКК) та підвищення якості ембріонів *in vitro*. Скринінгові дослідження біосумісності нанопокриттів – скло/АПТЕС; скло/АПТЕС/декстран; скло/АПТЕС/альбумін; скло/альбумін; скло/АПТЕС/декстран/альбумін, скло/полі(N-метакрилоїл-L-лейцин), біогель (на основі овальбуміну), проведено на клітинах лінії NIH3T3, клітинах HEK-293 нирки ембріона людини та первинних епітеліальних клітинах яйцепроводів і матки кролиць. Клітини інкубували у середовищі Ігла у модифікації Дальбекко (Dulbecco's modified Eagle's medium) з додаванням 10 % ФСТ, ("Sigma", США), 100 ОД/мл пеніциліну та 100 мкг/мл стрептоміцину ("Sigma", США) за температури $37 \pm 1^\circ\text{C}$ у CO_2 -інкубаторі в атмосфері 5 % CO_2 впродовж 72-ох год. Загальну кількість клітин визначали за допомогою лічильної камери Горяєва. Життєздатні клітин виявляли фарбуванням 0,1 % розчином трипанового синього ("Sigma", США). Метаболічну активність клітин у порівнянні з контролем оцінювали за сумарною активністю мітохондріальних дегідрогеназ у МТТ-тесті ("Sigma", США). Через 24, 48 та 72 год культивування клітин відбирали кондиційне середовище для визначення активності лактатдегідрогенази (ЛДГ) та концентрації глюкози.

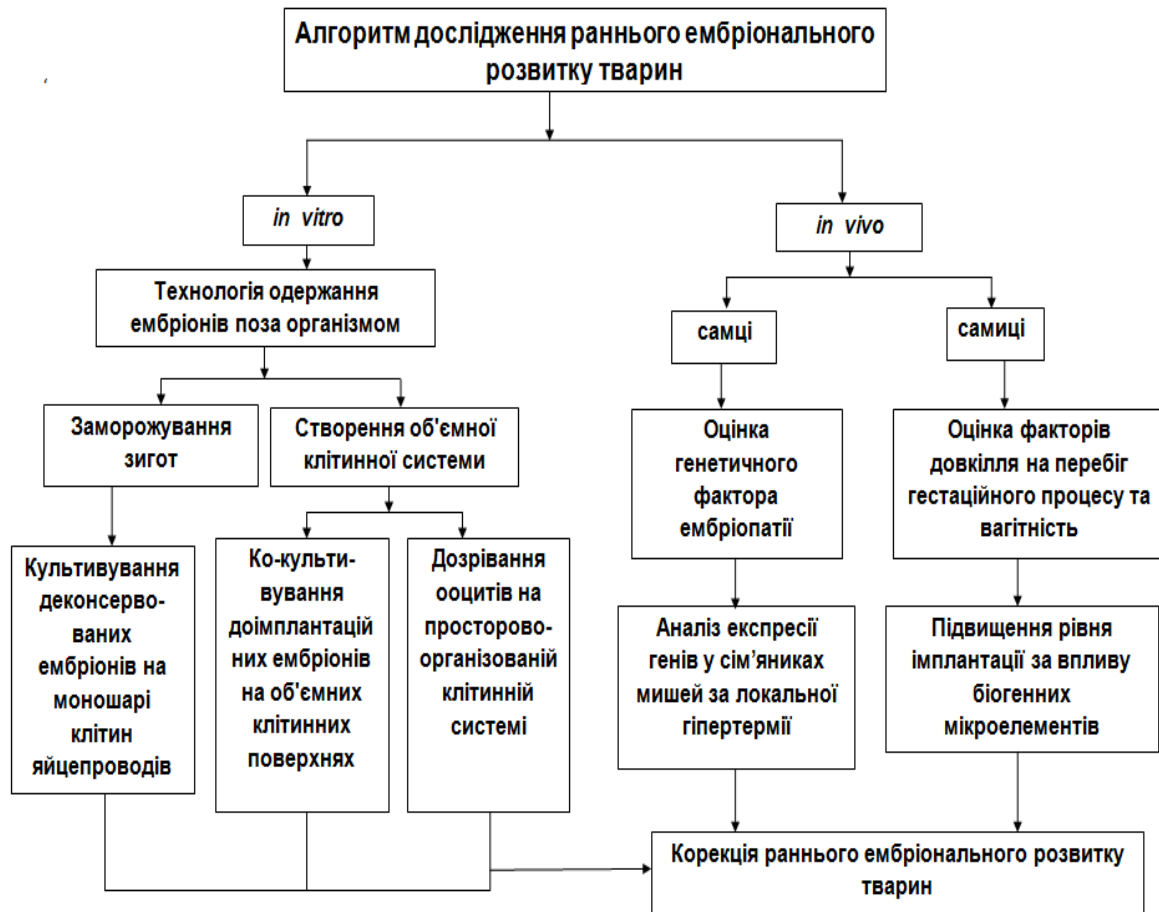


Рис. 1. Загальна схема досліджень

ОКК кролів аспірували з преовуляторних фолікулів з яєчників забитих здорових тварин. Відібрані ОКК відмінної та доброї якості із багат шаровим кумулюсом, однорідною та світлою ооплазмою, поділяли на групи по 30 ОКК: Д 1 – ооцити культивували на нанопокритті з альбуміном, Д 2 – на біогелі; Д 3 – на моношарі клітин ендометрію; Д 4 – на просторово організованій системі клітин ендометрію, створеній на альбуміні; Д 5 – на просторово організованій системі клітин ендометрію на основі біогелю; контроль – у стандартному культуральному середовищі. ОКК культивували в 4-ох лункових планшетах (“Costar”) у середовищі TCM 199 (“Applichem”, Німеччина) з додаванням 10 % ФСТ, 2,5 мкг/мл ФСГ (“Sigma”, США), 1,0 мкг/мл естрадіолу (“Serva”, Німечина), 2,5 МО/мл ЛГ (“Serva”, Німечина), 2,0 мМ натрію пірувату (“Sigma”, США), 2,92 мМ кальцію лактату (“Sigma”, США), 40 мкг/мл гентаміцину впродовж 24-ох год за температури 38,5°C та 5 %-му вмісту CO₂ у повітрі. Морфологію ооцитів досліджували за наявністю полярного тільца після фарбування барвником Гімза (“Sigma”, США) за модифікованим методом Тарковського (Tarkovsky A. K., 1996; Freshney I., 2005).

Доімплантаційні ембріони миші отримували після синхронізації самиць за вищенаведеною схемою. Зародки на 2-ох клітинній стадії вимивали з ампульної ділянки яйцепроводів у середовище M2 (“Sigma”, США) під

бінокуляром. Після морфологічної оцінки зародки розділяли на групи по 15-17 ембріонів у кожній та переносили у підготовлені краплі (500 мкл) культурального середовища KSMO ("Millipore", США) з 5 % ФСТ і клітинами яйцепроводів або клітинами ендометрію кролиць з концентрацією $0,5 \times 10^6$ клітин/мл (контрольна група) та дві дослідні групи, клітини в яких культивували на біогелі (група Д 1) та нанопокритті з альбуміном (група Д 2). Ембріони культивували під мінеральним маслом у термостаті при 37°C упродовж 3-ох діб. Якість ембріонів оцінювали через кожні 24 год за морфологічними критеріями, здатністю до поновлення мітозу та частотою дроблення до стадії бластоцисти.

На 3-му етапі проводили експерименти щодо оцінки впливу стресових чинників на сперматогенез миші. Дослідження проводили на самцях мишей лінії FVB/N віком 3–3,5 місяці масою 28 г. Для моделювання термічного шоку *in vivo*, мишей після анестезії 2,5 % розчином Avertin ("Sigma", США) із розрахунку 15–17 мкл/г маси, поміщали у водяну баню з температурою води 42°C на 30 хв. Через 2, 4, 6 та 24 год після шоку проводили евтаназію мишей шляхом дислокації шийних хребців для відбору біологічного матеріалу. Для контрольної групи відбирали органи від тварин після анестезії. Сумарну РНК виділяли за допомогою реагента «TRIZOL REAGENT» ("Sigma", США) згідно інструкції виробника. Експресію генів аналізували методом зворотно-транскрипційної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР).

На 4-му етапі досліджено вплив екологічних чинників на перебіг гамето- та ембріогенезу самиць. При проведенні скринінгових досліджень *in vitro* у 1-й серії дослідів порівнювали потенційну токсичність кадмію хлориду, нікелю хлориду, купруму хлориду на первинних культурах клітин яйцепроводів корів та визначали часову залежність впливу цих сполук на первинних фібробластах корів. Цитотоксичну дію сполук визначали у діапазоні концентрацій: кадмію хлориду – 50-100 мкг/мл, нікелю хлориду – 100-150 мкг/мл, купруму хлориду – 100-200 мкг/мл, за їх впливу на клітини яйцепроводів за температури $37 \pm 1^\circ\text{C}$ впродовж 72-ох год. Для оцінки впливу часової експозиції досліджуваних солей на ріст клітин, водний розчин кадмію та нікелю хлориду в концентраціях 50 та 100 мкг/мл, відповідно, одноразово вносили в культуральне середовище з ембріональними фібробластами корів дослідних груп та інкубували за присутності сполуки впродовж 3, 6, 24, 48 та 72 год. Через зазначені проміжки часу проводили заміну середовища на чисте і продовжували культивування до 72-ох год. Клітини, які не зазнавали впливу сполуки, були взяті за контроль.

На 5-му етапі проведено комплекс досліджень щодо підвищення рівня імплантації за впливу біогенних мікроелементів. У 1-ій серії дослідів проводили визначення оптимальної концентрації органічних сполук манган глютамату (у діапазоні концентрації 0,08-0,32 мкг/мл та 0,1 мкг/мл манган сульфату), цинк глютамату (від 0,1 до 0,25 мкг/мл та 0,1 мкг/мл цинк сульфату), хром-метіоніну (0,030-0,100 мкг/мл) на клітинах лінії N1H3T3 та первинній культурі клітин ендометрію кролиць за системними біомаркерами – динаміки проліферації та біохімічними показниками метаболічної активності культури (життєздатність за МТТ-тестом та активністю ЛДГ). У експериментах *in vivo*

вивчали запліднюючу та імплантаційну здатність самиць щурів за впливу манган та цинк глютаматів у ліпосомальній формі. За умов віварію Інституту біології тварин НААН проведено дослідження на статевозрілих самицях щурів лінії *Bistar* у віці 2,5-3 місяці вагою 180-200 г. Самок зі стійким ритмом естрального циклу розділяли на 5 груп по 10 тварин у кожній. Тваринам 1-ої та 2-ої дослідних груп одноразово підшкірно вводили глютамат мангану у формі ліпосомальної емульсії у дозі 2,75 мг/кг за 7 діб до запліднення (1 група) та при заплідненні (2 група), самицям 3-ої та 4-ої дослідних груп – цинк глютамат у дозі 3 мг/кг за 7 діб до запліднення (3 група) та при заплідненні (4 група). Тваринам контрольної групи вводили ліпосомальну емульсію без мікроелементів. Самиць синхронізували за вищенаведеною схемою та через 2-3 год після введення ХГЛ (“Прегніл”, Organon, Нідерланди) парували з самцями у співвідношенні 2:1. Першу добу вагітності визначали за наявністю сперматозоїдів у піхвових мазках. Декапітацію щурів за анестезії ефіром проводили на 14-ту добу вагітності. Після вилучення матки з яєчниками, визначали кількість жовтих тіл у яєчниках, місць імплантацій, кількість живих плодів та кількості резорбцій у матці та обраховували доімплантаційну та післяімплантаційну летальність, загальну ембріональну смертність, абсолютну та відносну масу яєчників, індекс впливу досліджуваних сполук (Онул Н.М., 2013).

Вивчення впливу комплексного препарату «Ліпоорганік» (ТУ У 21.2-30995014-00:2018; Пат. № UA 105740 U) проведено на статевозрілих кролицях породи «Карпатський панон» 3-3,3 місячного віку, масою 3,2-3,5 кг відібраних за принципом аналогів. Тварин поділяли на 3 групи: контрольну та дві дослідні по 10 голів в кожній. Кролицям 1-ої дослідної групи за 14 діб до осіменіння підшкірно вводили ліпосомальний препарат з розрахунку 1,5 мл/кг маси тіла, а кролицям другої дослідної групи – у дозі 1,5 мл/кг при осіменінні. Для синхронізації статевого циклу тваринам усіх груп внутрішньом’язово вводили 40 МО ГСЖК (Фолігон, “Інтервет”, Голландія). Через 28 год усіх тварин осіменяли свіжоодержаною спермою кролів у концентрації 10×10^6 сперміїв/0,5 мл/самку. Одразу після осіменіння овуляцію індукували аналогом гонадотропін-рилізінг гормону (Фертагіл, “Інтервет”, Голландія) в дозі 0,2 мл/самку. На 14-ту добу сукрільності проводили забій кролиць та відбирали зразки крові і тканини для проведення біохімічних та гематологічних досліджень.

При проведенні досліджень були дотримані усі критерії, правила та технологічні стандарти щодо роботи з тваринами. Експерименти на тваринах проводили відповідно до Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей» від 18.03.1986 р., директиви ЄС № 609 від 24.11.1986 р. і «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики у Києві 2001 р., що підтверджено Комісією з біоетичної експертизи Інституту біології тварин НААН (протокол № 68 від 14.03.2018 р.).

Матеріалом дослідження слугували культури клітин, ОКК, зиготи, тканини (матка, яєчники, яйцепроводи, печінка), кров. Визначення активності лужної фосфатази (ЛФ; ЕС 3.1.3.1), аланінамінотрансферази (АЛТ; ЕС 2.6.1.2), аспартатамінотрансферази (АСТ; ЕС 2.6.1.1), лактатдегідрогенази (ЛДГ, КФ 1.1.1.27), γ -глутаматтрансферази ГГТФ; ЕС 2.3.2.2), вмісту загального протеїну, концентрації сечовини та глюкози, вмісту загального холестеролу, триацилгліцеролів, ліпопротеїнів низької (ЛПНЩ) та високої щільності (ЛПВЩ) проводили уніфікованими лабораторними методами з використанням наборів реактивів фірми "Human" (Німеччина) на автоматичному біохімічному аналізаторі "Humalyzer 2000" (Німеччина).

Визначали такі показники: активність супероксиддисмутази (СОД; ЕС 1.15.1.1; Дубініна Е. Е, 2001), каталазну активність (КАТ; ЕС 1.11.1.6; Королюк М. А., 1998), активність глутатіонпероксидази (ГП; ЕС 1.11.1.9; Моин В. М., 1985), вміст церулоплазміну (ЦП, ЕС 1.16.3.1; Лушак В. І., 2004), вміст дієнових кон'югатів (ДК; Стальна І. Д., 1977), окисну модифікацію протеїнів (ОМП; Дубинина Е.Е., 2001), вміст гідропероксидів ліпідів (ГПЛ; Стальна І. Д., 1977), концентрацію ТБК-активних продуктів (ТБК-АП; Гаврилова В.Б., 1987).

Статистичну обробку результатів досліджень проводили за допомогою комп'ютерного пакету програм OriginPro 8.5 (Microcal, США) з використання однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA). Досліди проводили у трьох паралелях для кожного варіанту контрольних і експериментальних умов. Статистичне опрацювання результатів досліджень проводили з використанням t-критерію Ст'юдента. Відмінності отриманих результатів при рівні значимості $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Удосконалення методів ембріональної біотехнології. Інтенсивний розвиток репродуктивних технологій потребує забезпечення достатньою кількістю біологічного матеріалу, тому кріоконсервування репродуктивних клітин та ембріонів та їх тривале зберігання є однією з найбільш актуальних проблем сучасної біотехнології відтворення. Широке впровадження методу вітрифікації обмежується необхідністю використання високих концентрацій кріопротекторів, що погіршує розвиток і приживлення ембріонів доїмплантаційних трансферабельних стадій після розморожування. Тому застосування культуральної системи клітин яйцепроводів для відновлення та розвитку деконсервованих ембріонів мишей на стадії двох пронуклеусів в умовах *in vitro* було завданням даної серії експериментів (табл. 1).

Результати культивування показали, що розвиток деконсервованих ембріонів, вітрифікованих у розчині ЕГ та ДМСО до стадії морули за умов культивування на фідерному моношарі був вищим (65,57 %), порівняно з аналогічним за складом кріопротекторів варіантом (контрольна підгрупа В 3), ембріони якої культивувалися без фідерного моношару – 63,93 %. Ко-культивування ембріонів на моношарі клітин яйцепроводів дозволило підвищити показник дроблення ембріонів до стадії бластоцисти за вітрифікації

у розчині з ЕГ+ПВП та ЕГ+ДМСО, порівняно з групою кріоконсервованих ембріонів, які дозрівали *in vitro* без клітин у середовищі ДМЕМ на 6,38 та 6,55 % відповідно.

Таблиця 1

Вплив умов культивування на розвиток деконсервованих ембріонів на стадії 2-ох пронуклеусів за вітрифікації у різних кріопротекторах

Розвиток деконсервованих ембріонів до стадії	Системи культивування деконсервованих ембріонів		
	<i>Дослідна підгрупа</i> (культивування з клітинами яйцепроводів)		
	B1- 40 % ЕГ	B2- 35% ЕГ +5% ПВП	B3- 28% ЕГ+12% ДМСО
2-ох клітин, n	23	47	61
4-ох клітинних ембріонів, n (%)	19 (82,61±8,08)	40 (85,11±5,24)	52 (85,25±4,58)
8-ми клітинних ембріонів, n (%)	14 (60,87±10,41)	31 (65,96±6,98)	43 (70,49±5,88)
Морули, n (%)	13 (56,52±10,56)	24 (51,06±7,37)	40 (65,57±6,13)
Бластоцисти, n (%)	12 (52,17±10,64)	24 (51,06±7,37)	40 (65,57±6,13)
<i>Контрольна підгрупа</i> (культуральне середовище)			
Кількість	B1- 40% ЕГ	B2- 35% ЕГ +5% ПВП	B3- 28% ЕГ+12% ДМСО
2-ох клітин, n	23	47	61
4-ох клітинних ембріонів, n (%)	20 (86,96±7,18)	39 (82,98±5,54)	54 (88,52±4,11)
8-ми клітинних ембріонів, n (%)	16 (69,57±9,81)	30 (63,83±7,08)	42 (68,85±5,98)
Морули, n (%)	13 (56,52±10,56)	24 (51,06±7,37)	39 (63,93±6,19)
Бластоцисти, n (%)	12 (52,17±10,65)	21 (44,68±7,33)	36 (59,02±6,35)

Створення об'ємної культуральної системи для забезпечення дозрівання ооцитів та розвитку ранніх ембріонів *in vitro*. Одним з головних завдань клітинної біотехнології є вибір адекватного носія для клітин, оскільки тривале культивування клітин на носії-матриці впливає на функціональну активність, проліферативну здатність та диференціацію, гістогенетичні властивості клітин. Використання комплексної просторово організованої клітинної системи на основі різних наноповерхонь як природніх похідних, так і полімерних наношарах, дозволить створити оптимальні умови для дозрівання ооцит-кумулясних комплексів та підвищити якість ембріонів за їх культивування *in vitro*.

При порівнянні даних проліферативної та метаболічної активності клітин лінії NIH3T3 на поверхнях різної хімічної природи встановлено позитивний вплив всіх досліджуваних нанопокриттів на ріст клітин (рис. 2).

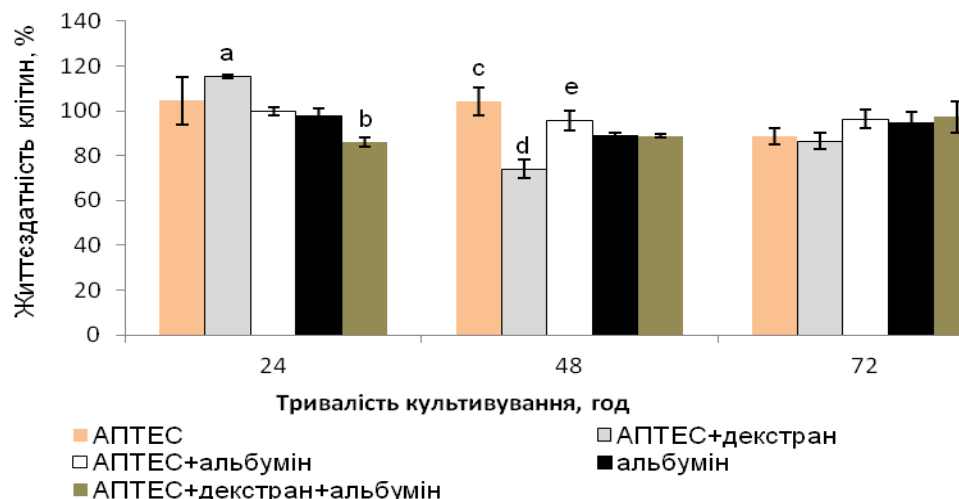


Рис. 2. Виживаність клітин лінії NIH3T3 при культивуванні на модифікованих поверхнях за МТТ-тестом, $M \pm m$; $n=3$

Примітка. Суперскриптами відмічено значення, які відрізняються з вірогідністю $p < 0,05$: ^{b:a}(АПТЕС+декстран+альбумін:АПТЕС+декстран) на 24 год; ^{d:c}(АПТЕС+декстран:АПТЕС); ^{e:d}(АПТЕС+альбумін:АПТЕС+декстран) на 48 год культивування

Результати досліджень показали високу життєздатність клітин усіх дослідних груп, що вказує про відсутність токсичних властивостей досліджуваних компонентів нанопокриттів та підтверджує можливість використання наноповітрянок для культивування клітин.

Проведено порівняльний аналіз проліферації та метаболічної активності ембріональних фібробластів лінії NIH3T3 та первинної культури клітин ендометрію кролиць на біогелі та альбуміні. Вірогідне збільшення концентрації клітин лінії NIH3T3 впродовж культивування виявлено у дослідній групі з біогелем ($p < 0,01$) на основі овальбуміну в порівнянні з контролем та дослідною групою з нанопокриттям на основі альбуміну (рис. 3).

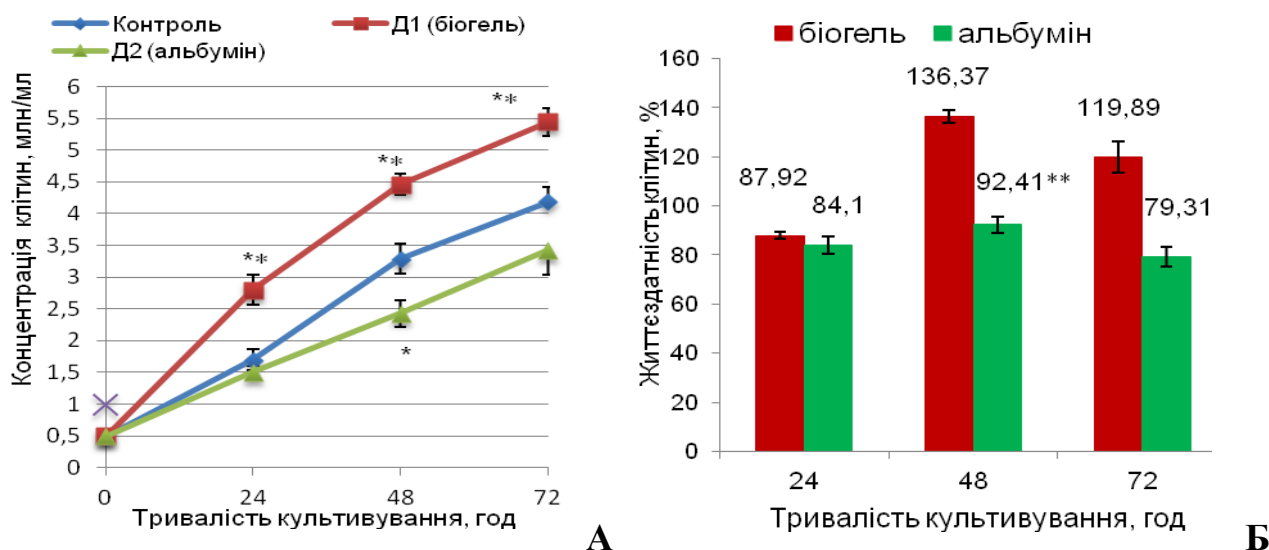


Рис. 3. Динаміка росту (А) та життєздатності (Б) клітин лінії NIH3T3 при культивуванні на біогелі та альбуміні, $M \pm m$; $n=3$

Примітка. У цьому і наступних рисунках та таблицях статистично вірогідні різниці між показниками контрольних і дослідних груп: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$.

Аналіз функціонального стану клітин за допомогою МТТ-реагенту виявив високу життєздатність клітин лінії НІНЗТЗ за культивування на біогелі впродовж усього періоду культивування. Життєздатність клітин 2-ої дослідної групи також була високою і знаходилась у межах 79,31-92,41 %, що вказує на позитивний вплив нанопокриття з альбуміном на проліферативну активність ембріональних фібробластів.

Дані, отримані при вивченні впливу нанопокриттів біогелю та альбуміну на культуру клітин ендометрію кролиць, виявили значне зростання проліферативної активності клітин за культивування на біогелі, що на 72-гу год спостереження у 1,4 та 1,2 раза перевищувала показники контролю та 2-ої дослідної групи.

Аналіз результатів дослідження виявив, що культивування клітин ендометрію на нанопокритті з альбуміном і, особливо, біогелем сприяє високій життєздатності клітин, що підтверджують біохімічні показники кондиційного середовища (ЛДГ, глюкоза) (табл. 2) та інтенсивність клітинного дихання (за МТТ-тестом) (рис. 4).

Таблиця 2

Біохімічні показники кондиційного середовища за культивування клітин ендометрію кролиць на біогелі та модифікованій наноповерхні з альбуміном, $M \pm m$; $n=3$

Група	Тривалість культивування, год		
	24	48	72
	ЛДГ, МО		
Контроль	$51,11 \pm 0,93$	$32,63 \pm 0,51$	$11,63 \pm 0,49$
Д ₁ (біогель)	$48,6 \pm 0,33$	$29,87 \pm 0,89^{***}$	$9,07 \pm 0,056$
Д ₂ (альбумін)	$48,5 \pm 0,67$	$30,1 \pm 0,6$	$9,13 \pm 0,38$
	Глюкоза, г/л		
	24	48	72
Контроль	$15,57 \pm 0,18$	$7,1 \pm 0,27$	$1,23 \pm 0,06$
Д ₁ (біогель)	$16,87 \pm 0,18$	$5,63 \pm 0,2$	$0,98 \pm 0,06$
Д ₂ (альбумін)	$15,86 \pm 0,15$	$6,23 \pm 0,2$	$1,04 \pm 0,04$

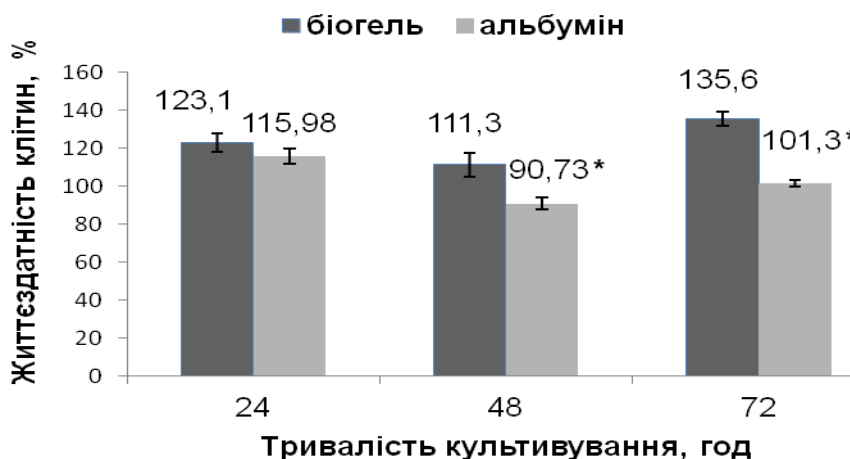


Рис. 4. Життєздатність клітин ендометрію кролиць після 72-ох год культивування на біогелі та модифікованій наноповерхні з альбуміном за МТТ-тестом, $M \pm m$; $n=3$

З аналізу даних щодо впливу об'ємної культуральної системи на дозрівання ОКК *in vitro* встановлено, що в 1-ій дослідній групі за умов культивування на просторовій системі клітин ендометрію, створеній на біогелі, кількість ініційованих до мейозу ОКК була найвищою, у порівнянні з іншими дослідними групами (табл. 3).

Таблиця 3

Дозрівання ОКК кролиць за різних умов культивування (n=30)

Група	Класифікація ОКК, n (%)		
	добрі	Метафаза II	дегенеровані
Контроль (ОКК у ДМЕМ)	4 (13,3±6,31)	17 (56,7±9,20)	9 (30,0±8,51)
Д ₁ (біогель+клітини+ОКК)	3 (10,0±5,57)	23 (76,7±7,85)	4 (13,3±6,31)
Д ₂ (біогель+ОКК)	4 (13,3±6,31)	20 (66,7±8,75)	6 (20,0±7,43)
Д ₃ (альбумін+ОКК)	5 (16,6±6,91)	14 (46,7±9,26)	11 (36,7±8,95)
Д ₄ (альбумін+клітини+ОКК)	4 (13,3±6,31)	16 (53,4±9,26)	10 (33,3±8,75)
Д ₅ (клітини+ОКК)	3 (10,0±5,31)	19 (63,3±8,95)	8 (26,7±8,21)

Культивування ОКК на просторовій системі клітин ендометрію з біогелем на 20 % підвищує дозрівання ооцитів до стадії метафази-II, інкубування зародків на біогелі без клітин дозволяє на 10 % збільшити мейотичне дозрівання, та тільки на 6,6 % більше ооцитів досягли стадії ооцита другого порядку при спів-культивуванні на моношарі клітин ендометрію.

За культивування 2-ох клітинних ембріонів миші на нанопокритті з біогелем рівень формування 6-8-ми клітинних ембріонів зріс на 23,53 %, тоді як при культивуванні на нанопокритті з альбуміном розвиток зигот до 8-ми клітинної стадії підвищився на 11,76 %, порівняно з показником контрольної групи (табл. 4).

Таблиця 4

Динаміка доімплантаційного розвитку ранніх зародків за умов культивування 2-ох клітинних ембріонів миші на об'ємній культуральній системі клітин ендометрію кролиць (n=17)

Група	Кількість ембріонів, які досягнули стадії, n(%)		
	6-8-ми клітин	морула	бластоциста
Контроль (ОС+ культура клітин ендометрію)	9 (52,94±12,47)	6 (35,29±11,95)	9 (52,94±12,47)
Дослід 1 (біогель + культура клітин ендометрію)	13 (76,47±10,60)	10 (58,82±12,30)	12 (70,58±11,39)
Дослід 2 (альбумін + культура клітин ендометрію)	11 (64,70±11,95)	8 (47,06±12,47)	10 (58,82±12,30)

Культивування 2-ох клітинних ембріонів на об'ємній культуральній системі клітин ендометрію, суттєво сприяє формуванню бластоцист, стимулює поділ бластомерів, зменшує кількість ембріонів з затримкою розвитку. Так, відсоток ембріонів, які досягнули бластоцисти був на 17,8 % вищим (70,7 %) у

1-ій дослідній групі у порівнянні до контролю (52,9 %) та на 11,9 % перевищував показник 2-ої дослідної групи (58,5 %).

Отже, досліджувані нанопокриття покращують адгезію клітин, стимулюють їх ріст і проліферацію, а їхнє застосування для створення просторової клітинної системи сприяє повноцінному дозріванню ОКК та розвитку ранніх ембріонів до передімплантаційних стадій в умовах *in vitro*.

Вплив екзогенних чинників на гаметогенез тварин. Антропогенне навантаження на довкілля призводить до напруження адаптивних резервів організму, що зумовлює зниження відтворювальної функції, адже для більшості ксенобіотиків характерні гонадо- та ембріотоксичні властивості (Кашин А.С., 2008; Гжегоцкий М.Р., 2014; Білецька Е.М., 2014). Оскільки важкі метали належать до пріоритетних екополлютатів сьогодення, з'ясування причин виникнення і розвитку порушень репродуктивної функції за впливу факторів довкілля, розробка способів профілактики, і є одним з напрямів сучасної біотехнології.

Для скринінгового вивчення цитотоксичності сполук металів як тест-об'єкт використано первинну культуру клітин яйцепроводів та ембріональні фібробласти корів, що дозволило провести експрес-оцінку впливу сполук, з'ясувати механізми їх дії на клітинному рівні та дослідити їх цито- та тканиноспецифічну токсичність.

У результаті досліджень виявлено, що кадмій хлорид за концентрації 50 та 100 мкг/мл викликає вірогідне інгібування проліферативного росту епітеліальних клітин яйцепроводу ($p < 0,01$; $p < 0,001$), гальмування утилізації глюкози ($p < 0,01$), зниження інтенсивності споживання Фосфору ($p < 0,05$; $p < 0,01$), активності лужної фосфатази, вмісту Кальцію впродовж 72-ох год культивування, що вказує на виражений цитостатичний/цитотоксичний ефект.

Водночас, нікель хлорид у концентраціях 100 та 150 мкг/мл істотно знижує виживання клітин яйцепроводів, їх здатність до поділу та функціональну активність на 72-гу год спостереження ($p < 0,05$; $p < 0,01$).

При вивченні часової залежності впливу нікелю хлориду у концентрації 100 мкг/мл на ембріональні фібробласти виявлено, що після 24-ох год культивування кількість життєздатних клітин знижувалась у 1,75 раза у всіх дослідних групах незалежно від тривалості інкубування клітин за присутності сполуки, однак за подальшого культивування спостерігали відновлення проліферативного росту клітин, проте їх концентрація була вірогідно нижчою порівняно з контролем (рис. 5).

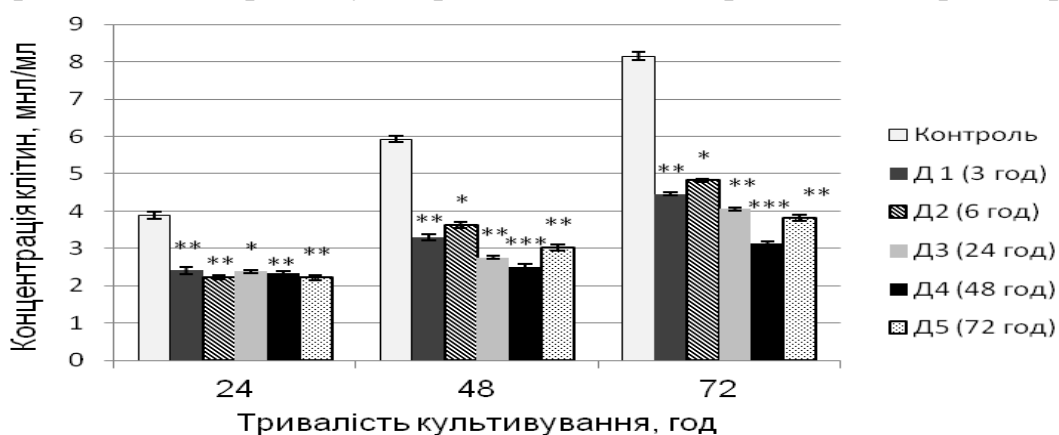


Рис. 5. Проліферація ембріональних фібробластів корів при інкубації їх з нікелю хлоридом, $M \pm m$; $n=3$

Найбільш суттєве відновлення функціональної здатності клітин спостерігали за короткотривалої дії нікелю хлориду впродовж 3-ох та 6-ти год культивування.

Порівняння результатів різної експозиції купруму хлориду показали, що максимально допустимими концентраціями, встановленими для клітин яйцепроводів корів, є 0,05 та 0,1 мкг/мл, вищі концентрації сполуки – 100-200 мкг/мл – проявляють виразну цитотоксичну дію (табл. 5).

Таблиця 5

Визначення максимально допустимої концентрації (МДК) купруму хлориду в культурі клітин яйцепроводів корів

Культура клітин	n	Тестовані концентрації купруму хлориду, мкг/мл					МДК, мкг/мл
		0,01	0,05	0,1	100	200	
Клітини яйцепроводів	5	—	—	—	+	+	0,1

Примітка: n – повторність дослідів; «+» - дегенерація моношару клітин; «-» - моношар клітин без ознак дегенерації (через 96 годин).

Підсумовуючи описані вище результати цього етапу роботи, можна констатувати вищу чутливість ембріональних фібробластів до дії хлоридів кадмію, купруму та нікелю у порівнянні з епітеліальними клітинами яйцепроводів корів, що характеризує зниження споживання глюкози, зміною регуляції гомеостазу цитозольного Кальцію та Фосфору, дисбалансом енергетичного забезпечення, що вказує на сповільнення обмінних процесів та інгібування росту клітин. Одночасно спостерігали відновлення функціональної здатності ембріональних фібробластів за короткотривалої дії кадмію хлориду та нікелю хлориду впродовж 3-ох та 6-ти год культивування. Згідно з проведеними експериментальними дослідженнями за величиною цитотоксичної дії на ембріональні фібробласти та клітини яйцепроводів корів досліджувані солі металів розміщено у наступному порядку: $\text{CdCl}_2 < \text{CuCl}_2 < \text{NiCl}_2$.

Вплив гіпертермії на сперматогенез миші. Сучасний стан репродукції пов'язаний зі стресами, забрудненням навколишнього середовища, що призводить до зниження чоловічої фертильності та безпліддя.

Проведеними у цій серії експериментів дослідження впливу стресових чинників на сперматогенез миші виявлено відмінність відповіді на дію гіпертермії у соматичних та статевих клітинах. Для досліджень було відібрано представники різних груп генів, які відповідають за клітинний поділ (*ErbB-3*, *Mdm1*), сперміо- та сперматогенез (*Dazl*, *Suv39h2*), регуляцію апоптозу (*Cideb*), транскрипцію і метаболізм (*Hdac 4*) та гени теплового шоку (*Hsp70*, *Hsp90aa1*, *Hspab1*, *Dnaja*).

Результати досліджень виявили тканинно-специфічний вплив гіпертермії на активність генів *Suv39h2*, *mDazl*, *Mdm1*, *c-fos*, *Hdac4* (рис 6).

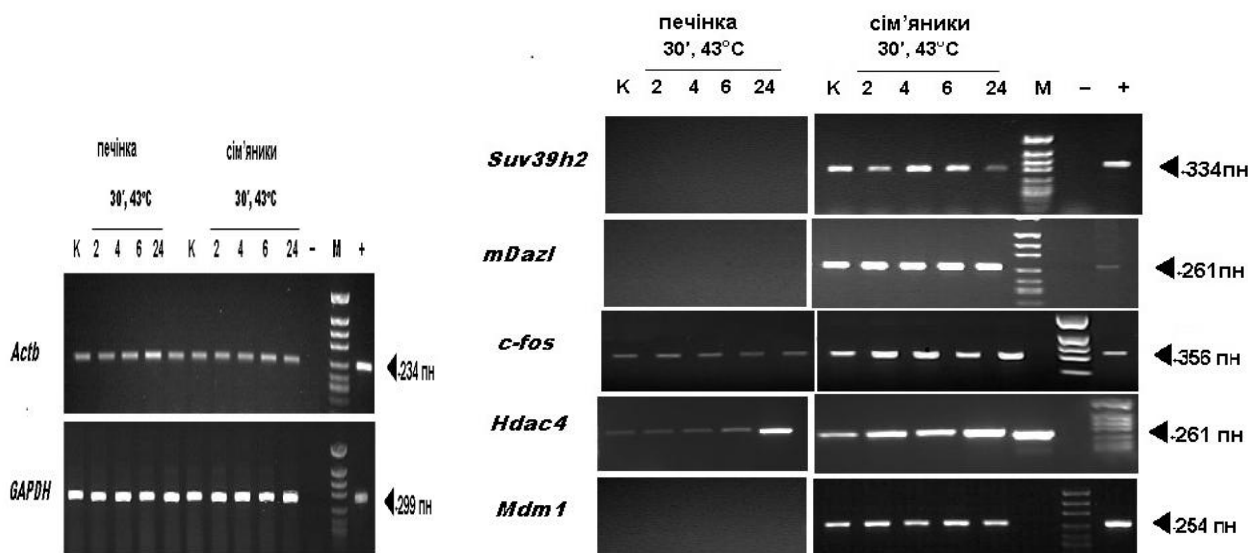


Рис. 6. Рівень експресії генів *Suv39h2*, *mDazl*, *Mdm1*, *c-fos*, *Hdac4* у тканинах печінки та сім'яників миші за гіпертермії. Тканини отримували на 2, 4, 6 та 24 год після теплового шоку. Праворуч представлена електрофореграма фрагментів маркера молекулярної маси М, цифрами позначено розмір продуктів ПЛР у парах нуклеотидних залишків (п.н.), (+) – позитивний контроль, (–) – негативний контроль, реакційна суміш без додавання кДНК. Результати порівнювали до контролю з використанням праймерів специфічних до *Actb* та *GAPDH*.

Електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР сім'яників показав наявність інтенсивних смужок продуктів тканинно-локалізованих генів *Suv39h2*, *mDazl*, *Mdm1*, що вказує на посилення експресії цих генів за дії теплового шоку у репродуктивних органах самців. Тоді як у продуктах ПЛР з печінки мишей, яких піддавали впливу гіпертермії, експресії цих генів не виявлено.

Для виявлення впливу гіпертермії на активність гена *Cideb* проведено аналіз рівня експресії цього гену у репродуктивних органах (сім'яниках і сперматоцитах) та печінці після одноразової дії теплового шоку за температури 38°C та 42°C.

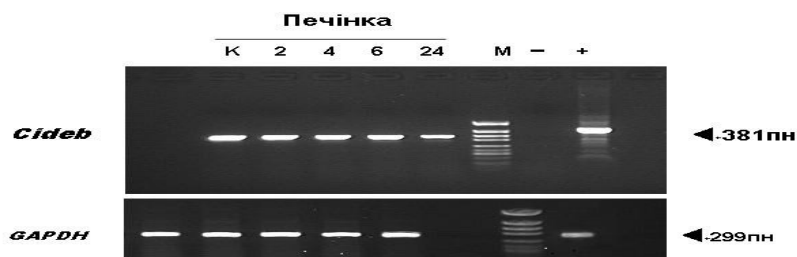


Рис. 7. Аналіз гена *Cideb* у печінці миші через 2, 4, 6 та 24 години від початку теплового шоку

На рис. 8 показано, що у сім'яниках миші за впливу гіпертермії за температури 38°C активність гену *Cideb* не змінюється, тоді як за підвищення

температури до 42°C рівень експресії гену посилюється як у сім'яниках, так і в сперматоцитах.

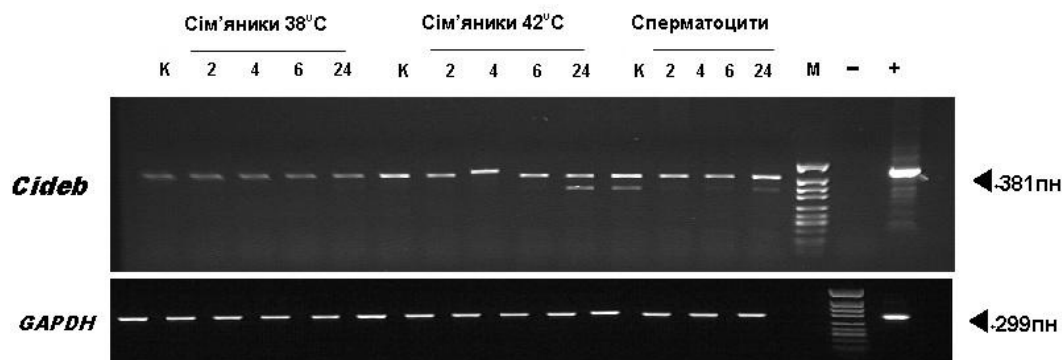


Рис. 8. Аналіз гену *Cideb* у сім'яниках та сперматоцитах миші через 2, 4, 6 та 24 години від початку теплового шоку

Крім того, у сперматоцитах контрольних та дослідних мишей, окрім основного фрагменту ДНК розміром 381 пн., який відповідає нативній формі гену *Cideb*, ідентифіковано додатковий фрагмент меншої величини, що ймовірно, відповідає альтернативному сплайсинг-варіанту мРНК *Cideb*. Ймовірно, що за гіпертермії середнього ступеню (43°C) індукція експресії додаткового сплайсинг-варіанту *Cideb* у сім'яниках миші є адаптаційною реакцією спеціалізованих мітотично активних клітин на дію теплового шоку.

Біотехнологічні підходи до стимуляції відтворювальної здатності самок кролиць за участі біогенних мікроелементів. Успішність відтворення визначається в отриманні здорового потомства і вимагає створення оптимальних умов для нормального функціонування організму в прегравідарний, гестаційний та період вагітності. Оптимальний вміст і співвідношення біогенних металів у організмі зумовлює нормальний перебіг обмінних процесів, сприяють змінам функціональної активності органів і систем, що позитивно впливає на фертильність та відтворення. Актуальність досліджень зумовлена необхідністю забезпечення мікронутрієнтами організму на прегравідарному етапі та у період гестації, а також їх використання як корегуючих метаболізм факторів при екологічно обумовленій дисфункції репродуктивної функції.

Завданням даного етапу досліджень було експериментально з'ясувати цитотоксичну активність та встановити оптимальну концентрацію глютаматів мангану та цинку, а також хром-метіоніну стосовно клітин лінії NIH3T3.

У порівняльному скринінгу різних концентрацій та сполук мангану на активність проліферації ембріональних фібробластів лінії NIH3T3 встановлено, що вищу ефективність проявляє манган глютамат у дозах 0,08 та 0,16 мкг/мл. Клітини, що інкубували за присутності низьких концентрацій глютаму мангану характеризуються високим рівнем життєздатності та інтенсивним ростом, порівняно з відповідними показниками контрольної групи (рис. 9).

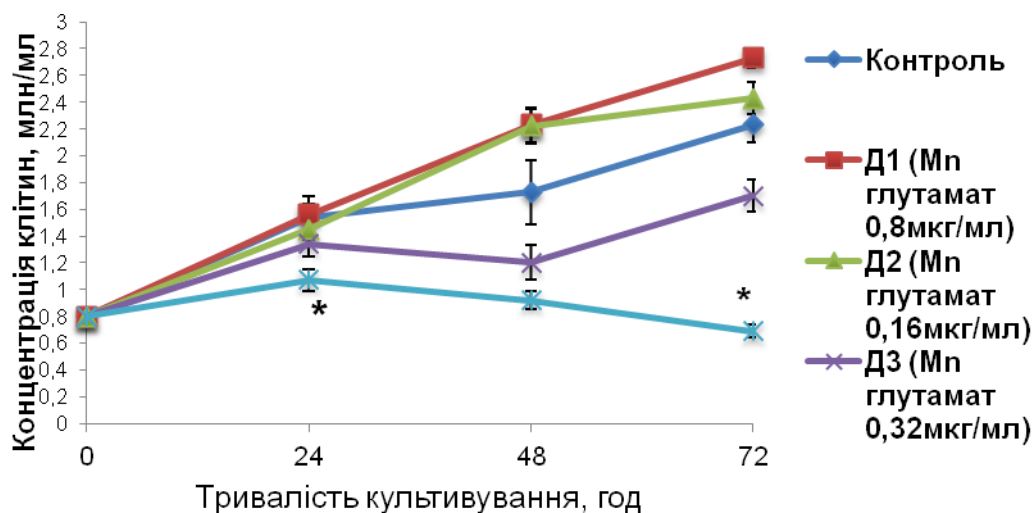


Рис. 9. Динаміка росту культури клітин лінії NIH3T3 за різних концентрацій сполук мангану

Вища концентрація мангану глютамату – 0,32 мкг/мл зумовила незначне інгібування проліферативної активності ембріональних фібробластів, зберігаючи при цьому функціональну активність культури, що підтверджено високими показниками життєздатності. При додаванні до клітин мангану сульфату спостерігається тенденція до поступового зниження проліферації клітин впродовж культивування як у порівнянні з контролем, так і в межах дослідних груп.

Аналізуючи дані щодо впливу досліджуваних сполук цинку встановлено, що внесення цинку глютамату у діапазоні концентрацій від 0,1 до 0,25 мкг/мл до клітин лінії NIH3T3 супроводжувалося підвищенням концентрації клітин ($p < 0,05-0,001$), високим рівнем життєздатності та зниженням вмісту ЛДГ у кондиційному середовищі ($p < 0,05-0,01$) впродовж культивування, у порівнянні з додаванням неорганічної форми – сульфату цинку.

Результати наступного етапу роботи з дослідження *in vivo* впливу цинку та мангану глютамату на запліднюваність та імплантаційну здатність самок щурів довели, що глютамат мангану сприяє ембріональному розвитку, що підтверджується підвищенням на 17,2 % та 26,4 % кількості живих плодів на 1 самицю відносно контрольної групи. Подібні відмінності виявлені також стосовно кількості резорбцій плодів між дослідними та контрольними групами (рис. 10).

За введення самицям щурів глютамату цинку до- та при заплідненні відмічено зростання кількості жовтих тіл вагітності в яєчниках та кількості ембріонів на одну самку порівняно з контрольною групою. Найнижчі показники постімплантаційної та загальної смертності ембріонів отримано за введення мангану глютамату при заплідненні самиць щурів, тоді як застосування цинку глютамату до запліднення сприяло зниженню передімплантаційної загибелі ембріонів, у порівнянні до відповідних показників контрольної групи.

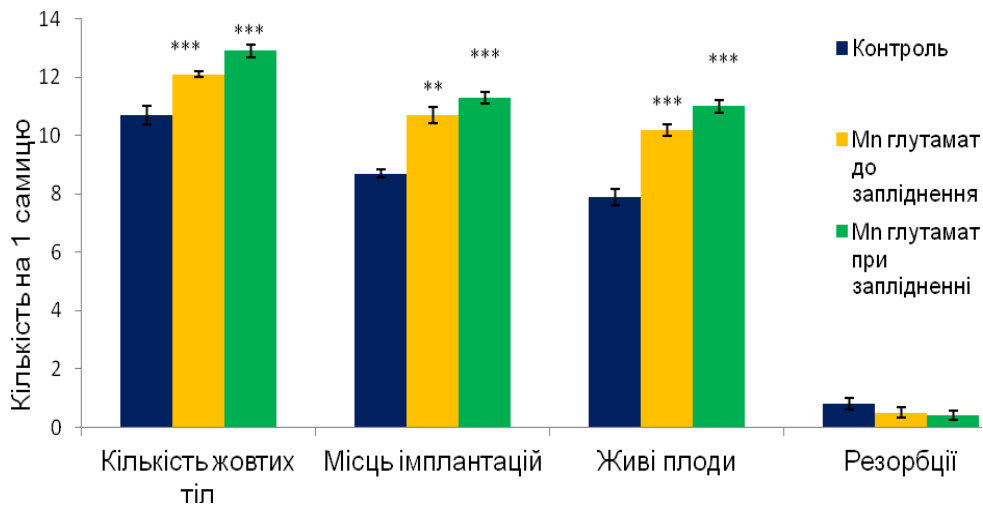


Рис. 10. Показники ембріогенезу щурів за впливу манган глутамату, $M \pm m$; $n=10$

Введення глутамату мангану та цинку до запліднення позитивно впливало на обмін речовин самки у підготовчий до вагітності період, зокрема сприяло посиленню ліпідного обміну. У порівнянні з контролем у дослідних групах за введення глутамату мангану та цинку до запліднення відмічено вірогідне збільшення кількості триацилгліцеролів, загального холестеролу та ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ) ($p < 0,001$). Зазначені зміни вказують про важливість забезпечення самок мікроелементами, зокрема Манганом та Цинком перед вагітністю, що дозволить створити сприятливі умови для синтезу стероїдів, необхідних для формування гормонального фону та підготовки до овуляції, імплантації та розвитку розвитку ембріонів.

Заключним етапом роботи було створення комплексного препарату органічних сполук мікроелементів пролонгованої дії «Ліпоорганік» для інтенсифікації репродуктивної функції та посилення ембріонально-маткової взаємодії у тварин. Експериментально доведено важливість застосування препарату «Ліпоорганік» для стимуляції відтворювальної здатності кролиць у підготовчий до запліднення (підшкірне введення за 14 днів до осіменіння) та імплантаційний (при заплідненні) період, який є одним з найбільш критичних періодів раннього ембріогенезу.

Ін'єкція препарату «Ліпоорганік» кролицям за 14 діб до синхронізації статевої охоти та осіменіння проявляє стимулюючу дію на метаболічні процеси у репродуктивній системі самок, зокрема, відмічається збільшення кількості жовтих тіл вагітності в яєчниках, місць імплантацій та кількості живих ембріонів та найнижчий відсоток доімплантаційної летальності плодів у порівнянні до контрольної групи (табл. 6).

**Морфологічні дослідження репродуктивних органів кролиць за дії
комплексного препарату, $M \pm m$, $n=5$**

Показники/Групи	Контроль	Дослідна 1	Дослідна 2
Кількість жовтих тіл на одну самку	10,8 \pm 1,02	11,8 \pm 0,74	12,4 \pm 0,37
Кількість місць імплантацій	9,8 \pm 1,52	10,8 \pm 0,74	11,2 \pm 0,37
Кількість живих плодів	9,2 \pm 1,36	10,2 \pm 1,14	10,8 \pm 0,37
Кількість місць резорбцій	0,4 \pm 0,24	0,4 \pm 0,24	0,2 \pm 0,18
Доімплантаційна летальність, %	11,1	10,2	11,3
Постімплантаційна летальність, %	4,2	3,7	1,82
Загальна ембріональна смертність, %	14,8	13,5	12,9

Введення препарату «Ліпоорганік» при осіменінні стимулює репродуктивну здатність кролиць, запліднення, імплантацію та розвиток ембріонів, оскільки у цій дослідній групі виявлена найбільша кількість жовтих тіл вагітності, кількість живих плодів, місць імплантацій та найнижча кількість місць резорбцій та відсоток постімплантаційної загибелі плодів.

Введення ліпосомального препарату органічних сполук мікроелементів до та після осіменіння викликає збільшення концентрації загального холестеролу, триацилгліцеролів і ЛПНЩ та ЛПВЩ, знижує інтенсивність окисних процесів, що проявляється у вірогідному зменшенні накопичення кінцевих продуктів ПОЛ та окисної модифікації білків у крові тварин обох дослідних груп, підвищує активність церулоплазміну та позитивно впливає на стан клітинних мембран ендометрію завдяки зниженню окисних процесів та підвищенню активності ферментів антиоксидантного захисту.

Отримані дані досліджень вказують про зниження вмісту альдегідних (ОМП₃₇₀) і кетонів (ОМП₄₃₀) похідних окисної модифікації протеїнів у крові кролів дослідних груп (рис. 11). Так, відзначено вірогідне зниження ОМП₃₇₀ у крові тварин 1-ої та 2-ої дослідних груп, а також ОМП₄₃₀ – у першій дослідній порівняно з аналогічними показниками тварин контрольної групи. Встановлено вірогідне зниження вмісту ТБК-активних продуктів у крові кролиць дослідних груп ($p < 0,01$; $p < 0,001$) після застосування препарату за 14 днів до осіменіння та при заплідненні самиць на 33,3% та 40,15%, відповідно, порівняно до показників тварин контрольної групи. Це вказує, що введення досліджуваних препаратів нормалізує окисні процеси, та не викликає інтенсифікації перекисного окиснення ліпідів, зокрема, у такі стресові для організму періоди, як запліднення та вагітність.

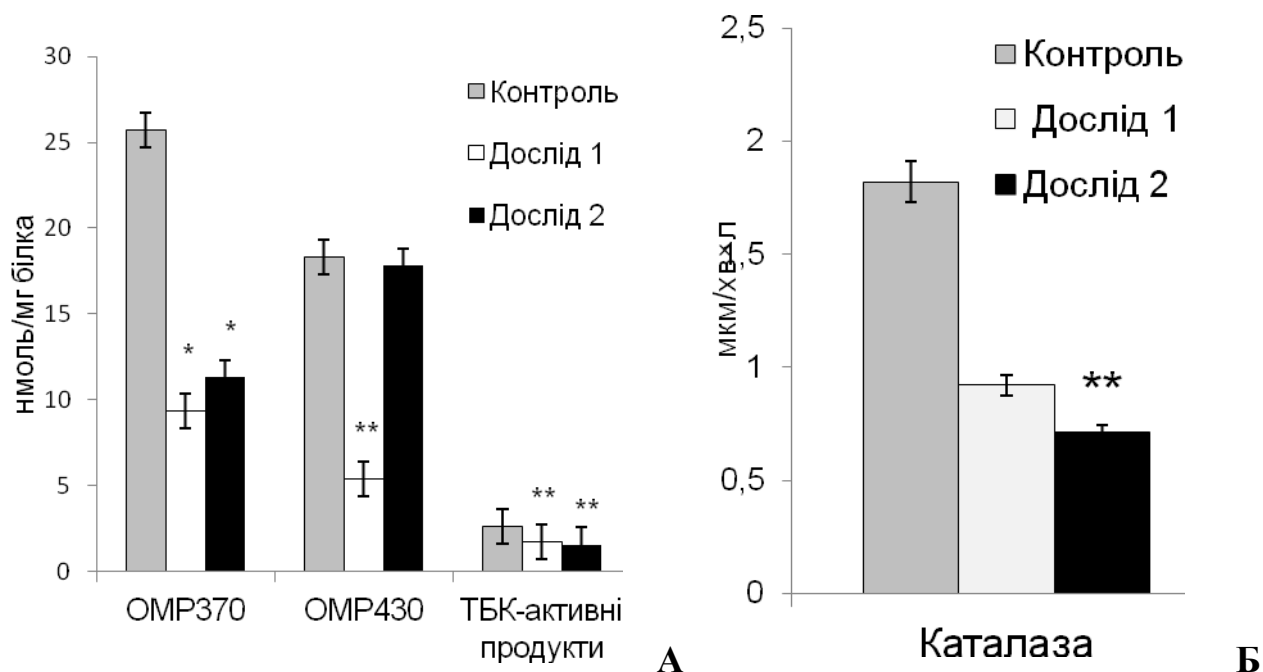


Рис. 11. Вміст кінцевих продуктів окисної модифікації ліпідів і протеїнів (А) та активність каталази (Б) у крові кролиць за дії комплексного препарату, $M \pm m$, $n=5$

Аналіз результатів визначення активності СОД у сироватці крові кролиць виявив, що її рівень у дослідних групах не відрізняється від показників контролю. Активність каталази була нижчою у крові дослідних кролиць порівняно з показником контрольної групи. Це вказує на участь ензимів антиоксидантної системи організму в інактивації окисних процесів, що виражалось у зниженні вмісту продуктів ПОЛ та ОМП.

Підсумовуючи отримані результати можна стверджувати, що введення дослідним тваринам комплексного препарату до та при осіменінні призводило до інактивації процесів пероксидного окислення ліпідів, що виражалось у зниженні вмісту ТБК-активних продуктів, гідропероксидів ліпідів та підвищенні активності ензимів АОС.

Досліджено можливість посилення репродуктивної функції кролиць в ранній період сукрільності при додаванні комплексного ліпосомального препарату органічних сполук мікроелементів у ліпосомальній формі до складу гранульованого комбікорму за 14 днів до осіменінні, а також у поєднанні зі введенням препарату «Ліпоорганік» при осіменінні. За додавання до корму ліпосомального препарату мікроелементів за 14 діб до запліднення, а також додатковому введенні кролицям ліпосомального препарату за осіменіння, мало місце збільшення кількості місць імплантацій ($p < 0,05$) та живих ембріонів ($p < 0,01$) у порівнянні до контрольної групи.

Згодовування ліпосомального препарату органічних форм мікроелементів у складі гранульованого комбікорму до осіменіння та поєднання згодовування та ін'єкції ліпосомального препарату «Ліпоорганік» при осіменінні кролиць позитивно впливають на систему антиоксидантного захисту, викликають підвищення інтенсивності ліпідного обміну, що приводить до активації гормональної перебудови організму кролематок в період сукрільності та забезпечує оптимальні умови для імплантації та розвитку плодів.

Отже, отримані у дисертаційній роботі результати дозволяють сформулювати фундаментальні уявлення про вплив екзогенних чинників на відтворювальну здатність самиць, детермінованість ембріогенезу характером і ступенем порушень чоловічої та жіночої репродуктивної функції за гаметогенезу ссавців внаслідок дії екологічних факторів та дисбалансу мікроелементного статусу організму (рис. 10).

Чинники антропогенного характеру призводить до напруження адаптаційних резервів організму, що, в однаковій мірі, негативно впливає на відтворювальну функцію самиць та самців.

Негативний вплив факторів довкілля на репродуктивну систему проявляється у порушенні відтворювальної функції, сперматогенезу, зниження плодовитості, розвитку гінекологічних захворювань, порушенні перебігу вагітності. Вплив зазначених чинників призводить до дисбалансу функціонування гіпоталамо-гіпофізно-яйникової системи, що проявляється порушенням ендокринного та метаболічного профілів організму, функціональній активності яєчників, порушенням дозрівання фолікулів та гальмуванням овуляції.

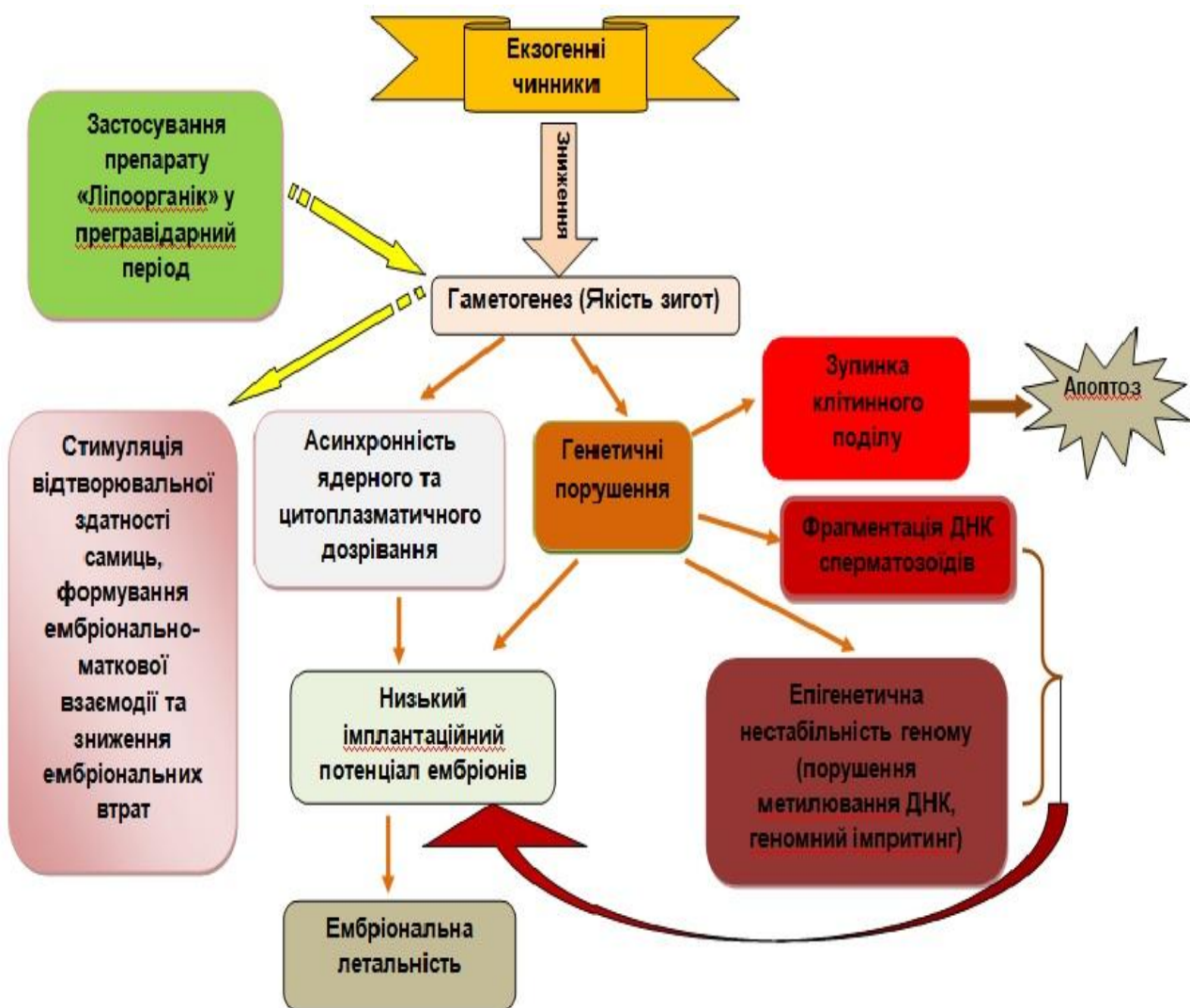


Рис. 12. Схема корекції гаметогенезу тварин за впливу екзогенних чинників

Для нормалізації відтворювальної здатності самиць та попередження негативної дії екопатологічних чинників на організм, розроблено комплексний ліпосомальний препарат органічних сполук мікроелементів, біопротекторна дія яких щодо активації імплантаційної та ембріональної здатності, посилення ембріонально-маткової взаємодії доведена у експериментальних дослідженнях. Ефективність біотехнологічного способу стимуляції відтворювальної здатності самиць підтверджена результатами виробничих перевірок та апробації препарату «Ліпоорганік».

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення та нове вирішення наукової проблеми із встановлення особливостей раннього ембріонального розвитку тварин за дії екзогенних чинників. Наукове завдання вирішене за допомогою сучасних біотехнологічних методів досліджень на модельних системах *in vitro* та *in vivo* з вивченням гаметогенезу у ссавців, імплантаційну здатність, особливостей ембріогенезу зумовлених впливом фізіологічних, генетичних, ембріональних, аліментарних факторів. Експериментально обґрунтовано застосування комплексного препарату органічних сполук мікроелементів «Ліпоорганік» для забезпечення організму самки мікронутрієнтами під час прегравідарного етапу та у період гестації.

На основі отриманих результатів сформульовано такі висновки:

1. Співкультивування деконсервованих доімплантаційних ембріонів миші на фідерному моношарі клітин яйцепроводів кролиць підвищує на 6,38–6,55 % їхній розвиток до стадії бластоцисти.
2. Запропоновано надшвидку твердоповерхневу вітрифікацію мікрокрапель у середовищі з 35 % ЕГ та 12 % ДМСО для заморожування зигот на стадії 2-ох пронуклеусів.
3. Створено просторову клітинну систему на основі природних та полімерних похідних та проведено скринінг біосумісності отриманих наноповерхонь на стандартизованих клітинних лініях та первинних репродуктивних культурах клітин. Встановлено високу життєздатність та ріст клітин на поверхнях, модифікованих полімерними наношарами з прищепленими макроланцюгами декстрану, АПТЕС (3-амінопропіл(триетокси)силан) та альбуміну, що підтверджує можливість використання модифікованих наноповерхонь для формування об'ємних клітинних моделей наближених до умов *in vivo*.
4. Ко-культивування ооцит-кумулюсних комплексів на просторово-організованих на основі біогелю системі клітин ендометрію підвищує на 16,7 % дозрівання ооцитів до стадії метафази-II і збільшує на 17,8 % розвиток 2-ох клітинних ембріонів миші до стадії бластоцисти, порівняно з моношаром клітин ендометрію.
5. Культивування ранніх ембріонів миші *in vitro* в умовах просторової системи клітин яйцепроводів кролиць, модифікованій альбуміном, а, особливо,

нанопокриттям з біогелем, позитивно впливає на життєздатність і розвиток зигот, сприяє дробленню зародків, компактизації, диференціації клітин, знижує на 13,3 % кількість дегенерованих ембріонів та підвищує хетчинг бластоцист, порівняно з моношаровою культурою клітин.

6. Гіпертермія (42°C, 30 хв) призводить до активації генів теплового шоку в печінці та сім'яниках. Крім генів раннього сперматогенезу *mDazl* (ген делеції при азооспермії), *Mdm1* (murine double minute 1, кодує ядерний протеїн, регулює дуплікацію центриолей), виявлено високий рівень експресії генів гістонової деацетилази *Hdac4* та метилтрансферази *Suv39h2*, які задіяні у епігенетичному репрограмуванні геному у чоловічих статевих клітинах, що впливає на запліднюючу здатність та ембріональний розвиток.

7. Встановлено експресію гена *Cideb* (індукуючий смерть клітини DFFA-подібний ефектор b) та його тканинну специфічність за дії гіпертермії у миші. Рівень експресії гена *Cideb* у тканинах печінки, кишківника і нирки посилюється, а в шлунку та сім'яниках миші знижується. У сперматоцитах миші за дії гіпертермії середнього ступеня ідентифіковано нову ізоформу транскрипту гена *Cideb*.

8. Найбільш виражений цитотоксичний вплив та функціональну активність ембріональних фібробластів та клітин яйцепроводів корів проявляє кадмію хлорид і купруму хлорид, а найменший – нікелю хлорид. Глутамати мангану і цинку, на відміну від мангану (II) сульфату і цинку сульфату, у досліджуваних концентраціях не мають цитотоксичного впливу на клітини лінії NIH3T3 впродовж їх 72-ох годинного культивування.

9. Підшкірне введення самкам щурів глутамату цинку і мангану у ліпосомальній формі збільшує масометричні параметри яєчників, число жовтих тіл вагітності та кількість живих плодів. Це відбувається за рахунок зниження на 7,06–7,29 % передімплантаційної та на 5,39–6,83 % постімплантаційної смертності, а також позитивно впливає на корекцію ліпідного обміну.

10. Створено комплексний ліпосомальний препарат «Ліпоорганік», що поєднує органічні та мінеральні сполуки біогенних елементів і підвищує відтворювальну здатність, ембріогенез, морфо-функціональний стан різних систем та обмінні процеси в організмі у підготовчий до запліднення період, а також ранній ембріональний розвиток. Підшкірне введення кролицям цього препарату за 14 діб до осіменіння знижує доімплантаційну загибель плодів, підвищує вміст холестеролу та ЛПНЩ, а також знижує у крові вмісту альдегідних і кетонних похідних окисної модифікації протеїнів (ОМП₃₇₀ та ОМП₄₃₀), знижує вміст дієнових конюгатів у ендометрії та вміст ТБК-активних продуктів у крові та матці кролиць.

11. Застосування препарату «Ліпоорганік» за осіменіння кролиць знижує у 2,3 раза постімплантаційну летальність та у 2 раза кількість резорбцій, сприяє корекції прооксидантно-антиоксидантної рівноваги – зниженню ТБК-активних продуктів і вмісту альдегідних похідних окисної модифікації протеїнів (ОМП₃₇₀) у крові, зниженню у матці вмісту дієнових кон'югатів, ОМП₃₇₀ та ОМП₄₃₀, ТБК-активних продуктів, вірогідному зростанню активності каталази.

12. Підшкірне введення ліпосомального препарату “Ліпоорганік” за осіменіння у поєднанні зі його згодовуванням проявляє суттєвий вплив на репродуктивну систему кролиць: вірогідно підвищується кількість місць імплантацій та живих ембріонів, знижується в 1,9 раза доімплантаційна та 2,3 раза постімплантаційна летальність.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Для оптимізації дозрівання ооцитів та ембріонів поза організмом рекомендовано використовувати об’ємну клітинну систему на основі модифікованих наноповерхонь декстраном, 3-амінопропіл(триетокси)силан (АПТЕС), альбуміном та біогелем.

Щоб підвищити ефективність отримання ембріонів ссавців запропоновано дорощувати ооцити та культивувати ембріони *in vitro* на об’ємній системі клітин яйцепроводу та ендометрію на основі біогелю та нанопокритті з альбуміном.

Рекомендовано підшкірно вводити кролицям препарат “Ліпоорганік” за 14 днів до осіменіння або при осіменінні у дозі 1,5 мл/кг, що посилює метаболічні процеси, покращує відтворювальну здатність самок кролиць, підвищує імплантаційну здатність, знижує до- і постімплантаційну смертність плодів та дозволяє одержати більшу кількість кроленят.

Ці рекомендації наведені в методичних рекомендаціях «Отримання функціоналізованих наноповерхонь для культивування клітин, ооцит-кумулясних комплексів та ембріонів тварин», навчально-методичному посібнику “Клітинні культури і можливості їх використання в ембріональній біотехнології”, Технічних умовах України (ТУ У) 21.2-30995014-00:2018 Препарат «Ліпоорганік», а також в патентах України на корисну модель (№56695, № 105740).

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Монографія:

1. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник / [Влізла В. В., Федорук Р. С., Ратич І. Б.,..... Штапенко О. В. та ін.]; за ред. В. В. Влізла. — Львів: Сполом, 2012. — 764 с. (Здобувачем взято участь у написанні окремих методів розділу 6, 23 та 32 довідника та інтерпретації даних).

Статті у фахових закордонних виданнях:

2. Raczowska J. Temperature-responsive peptide-mimetic coating based on poly(N-methacryloyl-L-leucine): properties, protein adsorption and cell growth / M. Ohar, Yu. Stetsyshyn, Zemla J., K. Awsiuk, J. Rysz, K. Fornal, A. Bernasik, H. Ohar, S. Fedorova, **O. Shtapenko**, S. Polovkovych, V. Novikov, A. Budkowski // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. — 2014. — 118. — P. 270-279 (*Scopus*). (Здобувачем виконано експериментальну частину на культурі клітин, проведено статистичну обробку даних та їх аналіз).

3. **Shtapenko O.** Effect of liposomal prepare with some organic trace elements on antioxidant status and reproductive ability of female rabbits / O. Shtapenko, I. Gevkan, Ye. Dzen`, S. Fedorova, Yu. Sluvchyk, V. Syrvatka, I. Matiukha // Scientific Papers. Series D. Animal Science. Vol. LVIII, 2015 ISSN 2285-5750. — P. 221-227 (**Web of Science**). *(Здобувачем виконано дослідження, узагальнено отримані дані та написано статтю).*

4. **Shtapenko O.** Comparative toxicity screening of organic and inorganic copper salts on oviduct epithelial cell culture in vitro / O. Shtapenko, I. Hevkan, S. Fedorova, Yu. Slyvchuk, I. Matuha, V. Syrvatka // Living organisms and bioanalytical approaches for detoxification and monitoring of toxic compounds. — Rzeszów, 2015. — P. 215-223. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, узагальнено одержані результати та написано статтю).*

5. **Shtapenko O.** The influence of trace elements in the form of liposomal compounds on antioxidant defense system and parameters of oxidative stress in the reproductive organs of female rabbits / O. Shtapenko, I. Matiukha, I. Hevkan, H. Tkachenko // Slupskie Prace Biologiczne — 2015. — № 12. — P. 173-186. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, опрацьовано літературні дані, написано статтю).*

Статті у вітчизняних фахових виданнях:

6. **Shtapenko O. V.** Formation and properties polymer nanolayers to enhance cell growth *in vitro* / O. V. Shtapenko, I. I. Gevkan, Yu. I. Sluvchyk, V. Y. Syrvatka, N. M. Matvienko // Innov. Biosyst. Bioeng. — 2018. — Vol. 2, no. 2. — P. 105-109. *(Здобувачем проведено дослідження, їх аналіз, опрацьовано літературні дані та написано статтю).*

7. **Shtapenko O. V.** Effect of organic microelements liposomal form on fertilizing ability and antioxidant status of female rabbits / O. V. Shtapenko, I. I. Gevkan, Yu. I. Sluvchyk, Ye. O. Dzen`, V. Y. Syrvatka, N. M. Matvienko // Biotechnologia Acta. — 2018. — T. 11, № 4. — С. 50-56. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, аналіз одержаних даних, написано статтю).*

8. **Штапенко О. В.** Особливості цитотоксичного впливу кадмій хлориду на клітини *in vitro* // О. В. Штапенко, І. І. Гевкан, Ю. І. Сливчук // Біологія тварин. — 2018. — Том 20, №1. — С. 123-130. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їх узагальнено та написано статтю).*

9. **Штапенко О. В.** Вплив хлориду нікелю на морфофункціональні та метаболічні характеристики клітин *in vitro* / О. В. Штапенко, Ю.І. Сливчук, І. І. Гевкана // «Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету ім. Володимира Гнатюка. Серія: Біологія. — 2018. — № 2(73). — С. 68-73. *(Здобувачем проведено дослідження, їх аналіз, опрацьовано літературні дані та написано статтю).*

10. **Штапенко О. В.** Вплив органічної сполуки манган глютамату на імплантаційну здатність самок щурів / О. В. Штапенко, І.І. Гевкан, Ю. І. Сливчук, В.Я. Сирватка, Н.М. Матвієнко // Вісник проблем біології та медицини. — 2018. — Том 9, Вип. 2. — С. 171-175. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, їх узагальнено та написано статтю).*

11. **Штапенко О. В.** Ефективність ДНК інтеграції і виживаність зигот мишей за умов пронуклеарної мікроін'єкції / О. В. Штапенко, А. В. Мадіч, С. В. Федорова // Вісник Львівського університету ім. Івана Франка. Серія біологічна. — 2017. — Вип. 76. — С. 45-53. *(Здобувачем проведено дослідження, опрацьовано літературні дані та написано статтю).*
12. **Shtapenko O.** The influence of surfaces modified by different polymeric on the growth of mouse embryonic fibroblasts cell line NIH3T3 / **O. Shtapenko** // Біологія тварин. — 2017. — Том 19, №2. — С. 121-126.
13. **Штапенко О. В.** Вплив об'ємної клітинної системи на дозрівання ранніх ембріонів мишей *in vitro* / О. В. Штапенко, Н.М. Матвієнко // «Науковий вісник Чернівецького університету. Серія: Біологія (Біологічні системи)». — 2017. — Том 9, Вип. 1. — С. 51-56. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, їх аналіз, опрацьовано літературні дані та написано статтю).*
14. **Штапенко О. В.** Обмін речовин за стимуляції відтворювальної здатності кролиць препаратом органічних мікроелементів у формі ліпосомальної емульсії / О. В. Штапенко, І.І. Гевкан, Ю. І. Сливчук, В.Я. Сирватка // «Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)». — 2017. — Том 9, Вип. 2. — С. 171-175. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, аналіз одержаних даних та написано статтю).*
15. **Shtapenko O.** Development of non- and vitrified-thawed pronuclear-stage mouse embryos co-cultured with oviduct epithelial cells / O. Shtapenko, S. Fyodorova, A. Madich // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія. — 2013. — Вип. 2(64). — С. 15-17. *(Здобувачем виконано дослідження, їх узагальнено та написано статтю).*
16. Огар М. Формування та властивості декстрановмісного покриття для контрольованої адсорбції альбуміну та вирощування клітин / М. Огар, Ю. Стецишин, А. Коструба, Н. Марінцова, Л. Журахівська, С. Федорова, **О. Штапенко**, В. Новіков // ДАН України. — 2013. — №5. — С. 511-517. *(Здобувачем виконано основну частину експериментального дослідження, аналіз одержаних даних та написано статтю).*
17. Федорова С.В. Проліферативний ріст та біохімічні зміни кондиційного середовища як показники функціональності за культивування клітин яйцепроводів кролів на модифікованих покриттях / С.В. Федорова, **О.В. Штапенко**, І.І. Гевкан, І.О. Матюха, О. Жолобко, М. Огар, Ю.Б. Стецишин, Ю. І. Сливчук // Біологія тварин. — 2013. — Том 15, №4. — С. 134-140. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, аналіз одержаних даних та написано статтю).*
18. **Штапенко О. В.** Вплив гіпертермії на експресію генів у тканинах мишей // О. В. Штапенко // Вісник Львівського університету ім. Івана Франка. Серія біологічна. — 2013. — Вип. 62. — С. 126-132.
19. **Штапенко О.В.** Вплив хром метіоніна на проліферативний ріст культури клітин ембріонального фібробласту / О. В. Штапенко // Аграрний вісник Причорномор'я / Збірник наукових праць. — 2012 — Вип. 62. — С. 158-162.

20. **Штапенко О.** Вплив модифікованих поверхонь скла на адгезію та проліферацію клітин меланоми миші лінії B16F10 / О. Штапенко, С. Федорова, І. Гевкан, Ю. Стецишин, О. Жолобко, М. Огар // Біологія тварин. — 2011. — Т. 13, №1-2. — С.484-487. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, їх узагальнено та написано статтю).*

21. Федорова С.В. Вміст ТБК-активних продуктів і гідроперекисів ліпідів та активність ферментів антиоксидантного захисту в гомогенатах внутрішніх органів самиць щурів при стимуляції ембріонально-маткового сигналу за умов введення селенвмісного препарату / С. В. Федорова, І. І. Гевкан, **О. В. Штапенко**, Ю. І. Сливчук // Біологія тварин. — 2010— Том 12, №1. — С. 100-105. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та аналіз одержаних даних).*

22. **Штапенко О.В.** Проліферативний ріст фідерних клітин яйцепроводів у культурі при дії хлоридів кадмію, міді та нікелю / О. В. Штапенко // Аграрний вісник Причорномор'я. — 2010. — Вип.52. — С.104-108.

23. Мадіч А. Особливості одержання культури клітин ембріонального фібробласту овець / А. Мадіч, С. Федорова, І. Гевкан, Р. Кхан, **О. Штапенко**, Ю. Сливчук // Вісник Львівського університету ім. Івана Франка. Серія біологічна. — 2007. — Вип. 45. — С. 175-180. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, аналіз одержаних даних та взято участь у написанні статті).*

Праці у інших виданнях:

24. Клітинні культури і можливості їх використання в ембріональній біотехнології: навчально-методичний посібник (рекомендовано Міністерством освіти і науки, спорту та молоді Лист МОНмолодьспорту № 1/11 від 13.01.2012 року) / А. В. Мадіч, В. І. Шеремета, І. І. Гевкан, С. В. Федорова, **О. В. Штапенко**, Ю. І. Сливчук; К.: АртЕконом, 2012. — 144 с.: *(Здобувачем опрацьовано літературні дані та взято участь у написанні 6-х розділів посібника).*

25. Отримання функціоналізованих наноповерхонь для культивування клітин, ооцит-кумулясних комплексів та ембріонів тварин: метод. реком.; затв. вченою радою Інститут біології тварин (протокол №5 від 16.09.2015 р.) / **О. В. Штапенко**, І.І. Гевкан, Ю. Б. Стецишин, С. В. Федорова, Ю. І. Сливчук, В. Я. Сирватка; «ДНДКІ ВП КД». Львів, 2015. 28 с. *(Здобувач є співавтором усіх розділів).*

26. Технічні умови України (ТУ У) 21.2-30995014-00:2018 Препарат «Ліпоорганік» / **Штапенко О. В.**, Дзень Є. О. — 21 с. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, узагальнено результати і написано ТУ У).*

Патенти України на корисну модель:

27. Спосіб одержання фідерних клітин яйцепроводів: деклар. пат. на корис. модель 47452, Україна /Мадіч А.В., Гевкан І. І., **Штапенко О.В.**, Сливчук Ю.І., Федорова С. В.; № u200904658 заявл. 12.05.2009; опубл. 10.02.2010, Бюл. №3. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження та взято участь в оформленні патенту на корисну модель).*

28. Спосіб зниження рівня ембріональної смертності у кролематок: деклар. пат. на корис. модель 56695, Україна / **Штапенко О.В.**, Гевкан І. І., Дзень Є. О., Федорова С. В. № u20108053 заявл. 29.06.2010; опубл. 25.01.2011, Бюл. №2. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження та взято участь в оформленні патенту на корисну модель).*

29. Спосіб активації проліферативних процесів в культурі клітин епітелію яйцепроводів: деклар. пат. на корис. модель 51687, Україна / Гевкан І. І., Нікітенко А.М., **Штапенко О.В.**, Сливчук Ю.І., Федорова С. В. № u201001506 заявл. 15.02.2010; опубл. 26.07.2010, Бюл. № 14. *(Здобувач брала участь у проведенні досліджень та оформленні патенту на корисну модель).*

30. Середовище для підвищення активності проліферації клітин різних типів: деклар. пат. на корис. модель 54749, Україна / Сливчук Ю.І., Гевкан І.І., **Штапенко О.В.**, Федорова С.В. № u201005025; опубл. 25.11.2010, Бюл. № 22. *(Здобувач брала участь у проведенні досліджень та оформленні патенту на корисну модель).*

31. Препарат «Ліпорганік» для підвищення відтворювальної здатності кролематок: деклар. пат. на корис. модель 105740, Україна / **Штапенко О.В.**, Гевкан І.І., Сливчук Ю.І., Дзень Є.О., Сирватка В.Я., Матюха І. О., Федорова С. В. № u201505160 заявл. 26.05.2015; опубл. 11.04.2016, Бюл. № 7. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження та взято участь в оформленні патенту на корисну модель).*

Матеріали наукових конференцій, конгресів, симпозіумів та з'їздів:

32. Mikolajec M. The heat shock regulates *Mdm1* gene expression in spermatocytes / M. Mikolajec, A. Wojtas, **O. Shtapenko**, J. Korfanty, M. Kus-Liskiewicz, N. Vydra, A. Toma, W. Widlak // XLV Annual Meeting of the Polish Biochemical Society (September 20-23, 2010, Wisla, Poland). — 2010. — P. 133. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, які стосувалися клонування гену Mdm1).*

33. Kus-Liskiewicz M. Hsf1, the main regulator of the heat shock response, can act as transcriptional repressor / M. Kus-Liskiewicz, J. Polańska, M. Olbryt, J. Korfanty, A. Wojtas, **O. Shtapenko**, N. Vydra, A. Toma, W. Widlak // XIVth Gliwice Scientific Meetings (November 26-27, 2010, Gliwice, Poland). — 2010. — P. 71. *(Здобувачем виконано частину експериментального дослідження).*

34. Mikolajec M. *Mdm1* gene expression in spermatocytes is regulated by the heat shock transcription factor 2 / M. Mikolajec, A. Wojtas, **O. Shtapenko**, J. Korfanty, M. Kus-Liskiewicz, N. Vydra, A. Toma, W. Widlak // XIVth Gliwice Scientific Meetings (November 26-27, 2010, Gliwice, Poland). — 2010. — P. 73. *(Здобувачем виконано основну частину експериментального дослідження).*

35. **Штапенко О.В.** Стимуляция репродуктивной функции кролематок и оценка их физиолого-биохимических показателей крови при воздействии хром-метионина / О.В. Штапенко, Е.А. Дзень, С.В. Фёдорова // XV междунар. научно-практическая конф. «Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства», (октябрь 2012, г. Горки). — С. 60-65. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, написано тези).*

36. Федорова С. Пролиферативный рост как показатель функциональности и отсутствия цитотоксичности модифицированных нанопокровов при культивировании клеток эмбриональных фибробластов мышей линии *NIH3/T3* / С. Федорова, **О. Штапенко**, І. Гевкан, Ю. Стецишин, О. Жолобка, М. Огар // Сборник материалов. Ставрополь, Россия. — 2012.— С. 199-203. *(Здобувачем виконано основну частину експериментального дослідження, підготовлено тези до друку).*

37. **Штапенко О.В.** Аналіз рівня експресії генів у сім'яниках мишей за дії теплового шоку // Тези доповідей VI Міжнар. конф. молодих вчених “Біорізноманіття. Екологія. Адаптація. Еволюція.” (13-17 травня, 2013 р., м. Одеса). — Збірник наук. матеріалів Одеського національного університету ім. І.І. Мечникова — 2013. — С. 301.

38. **Shtapenko O.** Survival and development of pronuclear-stage mouse embryos after droplet vitrification in different vitrification solutions / O. Shtapenko, S. Fyodorova, A. Madich // «Mammalian Embryology Conference. Celebrating Work of Professor Andrzej K. Tarkowski» (25-26 October 2013 Warsaw, Poland). — 2013. — Р. 55. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, написано тези).*

39. Ohar M. Formation, structure and properties grafted sensitive polymer nanolayers on the base of the amino-acid derivatives / M. Ohar, Y. Stetsyshyn, A. Kostruba, J. Raczowska, N. Marintsova, S. Fyodorova, **O. Shtapenko**, V. Novikov // International conference «Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2013)» (25 August-1 September 2013, Bukovel, Ukraine). — Abstract book – Bukovel, Ukraine. — 2013. —Р. 299. *(Здобувачем узагальнено результати досліджень, взято участь у підготовці тез до друку).*

40. Огар М. Формування біосумісних термочутливих полімерних покриттів на основі полі(N-метакрилоїл-L-фенілаланіну) / М. Огар, Ю. Стецишин, А. Коструба, Н. Марінцова, С. Федорова, **О. Штапенко**, В. Новіков // Національна науково-технічна інтернет-конференція з міжнародною участю «Актуальні проблеми синтезу і створення нових біологічно-активних сполук та фармацевтичних препаратів» (23-25 квітня 2013 р. Львів). — С. 58. *(Здобувачем виконано узагальнення даних, взято участь у підготовці тез до друку).*

41. Огар М.О. Біологічно- активні прищеплені полімерні наночастиці полі(N-метакрилоїл-L-амінокислот) на поверхні скла / М. Огар, Ю. Стецишин, Н. Марінцова, С. Федорова, **О. Штапенко**, В. Новіков // Збірник тез доповідей IX Міжнародної конференції da Rostim 2013. “Фітогормони, гумінові речовини та інші біологічно активні сполуки для сільського господарства, здоров'я людини і охорони навколишнього середовища” (7-10 Жовтня 2013, м. Львів). — Тези допов. Львів: Нац. ун-т “Львівська політехніка”. — 2013.— С.99-100. *(Здобувачем проаналізовано наукові дані, взято участь у написанні тез).*

42. Raczowska J. Temperature-responsive peptide-mimetic coating based on poly(N-methacryloyl-L-leucine): Properties, protein adsorption and cell growth / Joanna Raczowska, Mariya Ohar, Yuriy Stetsyshyn, Joanna Zemła, Kamil Awsiuk, Jakub Rysz, Katarzyna Fornal, Andrzej Bernasik, Halyna Ohar, Svitlana Fedorova,

Oksana Shtapenko, Svyatoslav Polovkovych, Volodymyr Novikov, Andrzej Budkowski // 8th ECNP International Conference on Nanostructured Polymers and Nanocomposites (September 14-16, 2013, Dresden, Germany). – P. O30. *(Здобувачем виконано частину експериментального дослідження, взято участь у написанні тез).*

43. **Штапенко О. В.** Клонування гену *mdm 1* мишей та його експресія у трансформованих клітинах // Український біохімічний конгрес (6-10 жовтня 2014, м. Київ). – 2014. – Т. 86, № 5 (1). – с. 229.

44. **Shtapenko O.** Influence of some organic trace elements on biochemical profile and reproductive function of female rabbits / /O. Shtapenko, I. Hevkan, Y. Dzen`, S. Fedorova, Y. Slyvchuk, V. Syrvatka, I. Matuha // KRMIVA 2014, 21th International Conference (4 - 6 June, 2014, Opatija Hrvatska, Croatia). – 2014. – P. 60. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, їх узагальнено та написано тези).*

45. **Shtapenko O.** The influence of chromium methionine supplementation on haematological and biochemical indices and reproductive function of female rabbits during early pregnancy / O. Shtapenko, I. Hevkan, Ye. Dzen`, S. Fedorova // 5th International Young Scientists Conference „Human – Nutrition – Environment” “Biotechnology for sustainable development” (24-25 April, 2014, Rzeszów, Poland). – 2014. – P. 60. *(Здобувачем виконано узагальнення даних та написано тези).*

46. **Shtapenko O.** Effect of some microelements in liposomal forms on blood parameters in female rabbits during gestation / O. Shtapenko, I. Hevkan, Y. Dzen`, S. Fedorova, Y. Slyvchuk, V. Syrvatka, I. Matuha // International Scientific Symposium “Modern animal husbandry – strategies, opportunities and performances” (23-25 October, 2014, Iasi, University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Romania). – 2014. – P. 36. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, їх узагальнено та написано тези).*

47. **Штапенко О. В.** Порівняння проліферативної здатності клітин ендометрію при культивуванні на біогелі та модифікованому альбуміном покритті / О. В. Штапенко, С. В. Федорова, Ю. Б. Стецишин // Міжнар. науково-практична конференція “Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини” (2-3 жовтня 2014, м. Львів). – 2014. – С. 217. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, їх узагальнено та написано тези).*

48. **Shtapenko O.** Effect of the surfaces modified by different bioactive polymeric on the cell viability and proliferation / O. Shtapenko, S. Fedorova, I. Gevkan, Yev. Dzen`, Yu. Stetsyshyn // 9th International Conference – “Structure and Stability of Biomacromolecules” (SSB 2015). – Kosice, Slovakia. –2015. – P. 128-129. *(Здобувачем виконано узагальнення даних та написано тези).*

49. **Shtapenko O.** Changes in activities of antioxidant enzyme and biochemical indices in blood during gestation in rabbits under influence of some organic microelements in liposomal form / O. Shtapenko, Y. Dzen`, S. Fedorova, Y. Slyvchuk // XIIth International Conference of Young Researchers „Physiology and Biochemistry in Animal Nutrition” (23-24 September 2015, Łowicz, Poland). –2015.

– Р. 58. *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, їх узагальнено та написано тези).*

50. **Shtapenko O. V.** The impact of introduction organic microelements in liposomal form on oxidative stress biomarkers and antioxidant system in tissues of female rabbits / O. V. Shtapenko, , I. O. Matiukha, I. I. Gevkan // Біологія тварин. Тези доповідей міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини», присвяченої 55-річчю Інституту біології тварин НААН.– 2015. – Т. 17, № 3. – С. 188. *(Здобувачем виконано постановку експериментів, проведено аналіз отриманих даних та написано тези).*

51. **Shtapenko O.** The influence of organic zinc, manganese and chromium in liposomal form on antioxidant status and pregnancy outcome in rabbits // 20th International Symposium on Housing and Diseases of Rabbits, Furproviding Animals and Pet Animals (May 17 - 18, 2017, Celle, German). *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, їх узагальнено та написано тези).*

52. **Штапенко О. В.** Вплив просторово-організованої культуральної системи клітин гранульози на дозрівання ооцит-кумулясних комплексів / О. В. Штапенко, І. І. Гевкан, В. Я. Сирватка, Ю. І. Сливчук // Тези V Міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні проблеми біології, екології та хімії» (Запоріжжя, 2017). — 2017. *(Здобувачем виконано планування експериментального дослідження, проведено аналіз отриманих даних та написано тези).*

53. **Shtapenko O.** “Effect of zinc glutamate on embryogenesis of female rats” / Shtapenko O., Hevkan I., Dzen` Ye., Slyvchuk Y., Syrvatka V. // XXIV Symposium of immunology and reproduction with international participation (May 17-19, 2018, The Castle, Trest, Czech Republic). *(Здобувачем виконано експериментальні дослідження, написано тези).*

АНОТАЦІЯ

Штапенко О. В. Біотехнологічні аспекти регуляції гаметогенезу для корекції раннього ембріонального розвитку тварин. –На правах рукопису.

Дисертаційна робота на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України, 2019.

Дисертація присвячена вивченню впливу екзогенних чинників на процеси спермато- та ембріогенезу тварин за умов *in vitro* і *in vivo* та удосконалення біотехнологічних способів їх регуляції та корекції. Результати досліджень формують нові уявлення про особливості перебігу гаметогенезу ссавців за дії екзогенних чинників, що дозволяє з'ясувати причини виникнення і розвитку порушень репродуктивної функції та розробити профілактичні заходи їх попередження.

Розроблено методи об'ємної культуральної системи для культивування ооцитів та ембріонів *in vitro*, а також культивування культур клітин маткового

походження на поверхнях, модифікованих різними прищепленими полімерними біологічно сумісними наноповірхами. Культивування 2-х клітинних ембріонів миші на об'ємній культуральній системі клітин яйцепроводів та ендометрію, створений на біогелі, сприяє повноцінному розвитку ранніх ембріонів *in vitro*, стимулює поділ бластомерів, зменшує кількість ембріонів із затримкою розвитку та формуванню бластоцист.

Доведено, що використання культури клітин яйцепроводів кролиць для ко-культивування деконсервованих доімплантаційних ембріонів миші на 6,38–6,55 % підвищує рівень дроблення до стадії бластоцисти. На модельних системах в умовах *in vitro* та *in vivo* порушення гаметогенезу ссавців досліджено на всіх ланках репродуктивної системи від механізмів клітинної відповіді, розвитку гамет до імплантаційної здатності, посиленню ембріонально-маткової взаємодії та перебігу раннього ембріогенезу. Встановлено, що зниження відтворювальної здатності самиць, рання ембріональна летальність зумовлена характером і ступенем порушень чоловічої та жіночої репродуктивної функції ссавців за дії екологічних факторів, порушенням ендокринного та метаболічного профілів, дисбалансом мікроелементного статусу організму.

Для нормалізації відтворювальної здатності самиць та попередження негативної дії екопатологічних чинників на організм, розроблено комплексний ліпосомальний препарат органічних сполук мікроелементів, біопротекторна дія яких щодо активації імплантаційної та ембріональної здатності, посилення ембріонально-маткової взаємодії доведена у експериментальних дослідженнях. Ефективність біотехнологічного способу стимуляції відтворювальної здатності самиць підтверджена результатами виробничих перевірок та апробації препарату «Ліпоорганік».

Ключові слова: репродуктивна біотехнологія, цитотоксичність, біосумісність, тепловий шок, мікроелементи, клітина, ооцити, ембріони, культивування *in vitro*, сім'яники, миші, кролі

АННОТАЦИЯ

Штапенко О. В. Биотехнологические аспекты регуляции гаметогенеза для коррекции раннего эмбрионального развития животных. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – Национальный технический университет Украины «Киевский политехнический институт имени Игоря Сикорского» МОН Украины, 2019.

Диссертация посвящена изучению влияния экзогенных факторов на процессы спермато- и эмбриогенеза животных в условиях *in vitro* и *in vivo* и совершенствование биотехнологических способов их регуляции и коррекции. Результаты исследований формируют новые представления об особенностях течения гаметогенеза млекопитающих за действия экзогенных факторов,

позволяет выяснить причины возникновения и развития нарушений репродуктивной функции и разработать профилактические меры их предупреждения.

Разработаны методы объемной культуральной системы для культивирования ооцитов и эмбрионов *in vitro*, а также культивирования культур клеток маточного происхождения на поверхностях, модифицированных различными полимерными биологически совместимыми наноповерхностях. Культивирование 2-х клеточных эмбрионов мыши на объемной культуральной системе клеток яйцеводов и эндометрия, созданной на биогели, способствует полноценному развитию ранних эмбрионов *in vitro*, стимулирует деление бластомеров, уменьшает количество эмбрионов с задержкой развития и формированию бластоцист. Доказано, что использование культуры клеток яйцеводов крольчих для ко-культивирования деконсервированных доимплантационных эмбрионов мыши на 6,38-6,55% повышает уровень дробления до стадии бластоцисты.

На модельных системах в условиях *in vitro* и *in vivo* нарушения гаметогенеза млекопитающих исследованы на всех звеньях репродуктивной системы от механизмов клеточного ответа, развития гамет в имплантационной способности, усилению эмбрионально-маточной взаимодействия и течения раннего эмбриогенеза. Установлено, что снижение воспроизводительной способности самок, ранняя эмбриональная летальность обусловлена характером и степенью нарушений мужской и женской репродуктивной функции млекопитающих за действия экологических факторов, нарушением эндокринного и метаболического профилей, дисбалансом микроэлементного статуса организма.

Для нормализации воспроизводительной способности самок и предупреждения негативного воздействия екопатологических факторов на организм, разработан комплексный липосомальный препарат органических соединений микроэлементов, биопротекторна действие которых по активации имплантационной и эмбриональной способности, усиления эмбрионально-маточной взаимодействия доказана в экспериментальных исследованиях. Эффективность биотехнологического способа стимуляции воспроизводительной способности самок подтверждена результатами производственных проверок и апробации препарата «Липоорганик».

Ключевые слова: репродуктивная биотехнология, цитотоксичность, биосовместимость, тепловой шок, микроэлементы, клетка, ооциты, эмбрионы, культивирования *in vitro*, семенники, мыши, кролики

SUMMARY

Shtapenko O.V. Biotechnological aspects of regulation of gametogenesis for correction of early embryonic development of animals. – The manuscript.

The thesis for the degree of doctor of biological sciences, specialty 03.00.20 – biotechnology. – Institute of animal biology NAAS, Lviv. – National Technical University of Ukraine «Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute», Ministry of Education and Science of Ukraine. Kyiv, 2019.

The thesis is dedicated to the study of the influence of exogenous factors on the processes of spermatogenesis and embryogenesis of animals *in vitro* and *in vivo* and the improvement of biotechnological methods for their regulation and correction. In our investigation the most attention we have paid to the peculiarities of mammalian gametogenesis during the action of exogenous factors. It's allows to find out the causes of the emergence and development of reproductive function disorders and to develop preventive measures for their prevention.

We also set a goal to test in model systems *in vitro* and *in vivo* the mammalian gametogenesis to study at all levels the reproductive system from cellular response mechanisms, gametes development to implantation capacity, enhanced embryo-uterine interactions and early embryogenesis. It was established that reduction of reproductive ability of females, early embryonic mortality are connected with the nature and degree of violations of male and female reproductive function of mammals by environmental factors, violation of endocrine and metabolic profiles, imbalance of microelement status of an organism.

A methodology of cultivating of uterine cells on surfaces modified by various grafted polymeric biocompatible nanolayers, while creating a 3D cell culture system for cultivation of oocytes and embryos *in vitro*, was developed. It was found that the maturation of rabbit oocyte-cumulus complexes onto 3D cell culture system with endometrial cells created on biogel was higher as compared to other experimental groups. It was established that after 24 hours of cultivation on biogel, 76,7 % oocytes of the experimental group recovered meiosis and reached the metaphase stage II, while the number of oocytes with the polar body in the control group was 63.3%. The culturing of 2-cell mouse embryos onto volumetric culture system with endometrial cells created on the biogel promoted the development of pre-implantation embryos *in vitro*, stimulated the blastomerization and blastocyst formation and reduced the number of embryos with delayed development.

It has been proved that co-culturing of cryopreserved preimplantation mice embryos on the monolayer of oviduct rabbit cells increases the number of embryos reaching the blastocyst stage by 6.38-6.55%.

While studying the influence of stress factors on the spermatogenesis of mice, a difference in response to the action of hyperthermia in somatic and germ cells was revealed. It has been shown that the effects of heat shock on mice testicles alter the activity of the *mDazl* gene (azoospermia factor) and increase the expression level of methyltransferase *Suv39h2*, *Hdac4* histone deacetylase and *Mdm1* gene.

The pattern of the *Cideb* gene expression in mice tissues under the influence of local hyperthermia was analyzed. High expression levels of *Cideb* genes were observed in liver, intestine and kidneys, with low levels thereof found in the stomach and testis tissues of mice after a heat shock. However, a difference in the *Cideb* gene expression in the testes and spermatocytes depending on the degree of hyperthermia was detected. The expression of the gene does not change at 38°C, whereas in the case of a moderate hyperthermia of 42°C, the *Cideb* gene expression was observed in testes at 2, 6 and 24 hours after the heat stress. An alternative splice variant of the *Cideb* gene in the testes at the hyperthermia of 42°C was found.

For normalization of reproductive ability of females and prevention of negative action of ecopathological factors on an organism, a complex liposomal preparation of organic compounds of trace elements has been developed, their bioprotective action in activating implantation and embryonic capacity, strengthening of embryonal-uterine interaction has been proved in experimental research. The effectiveness of the biotechnological method of stimulating the reproductive capacity of females is confirmed by the results of industrial inspections and testing of the drug "Lipoorganik". Consequently, the screening of organic compounds of manganese, zinc and chromium on cell cultures, performed in order to determine the optimal concentration of trace elements and to study the effects of various doses and methods of zinc and manganese glutamates and chromium methionine administration on reproduction and activation of particular levels of metabolism in laboratory animals, allowed to develop a preparation containing organic trace elements for the activation of implantation and embryonic capacity, improvement of embryonal-uterine interaction in female rabbits.

Our studies indicated that the administration of the "Lipoorganic" liposomal preparation had a beneficial effect on the correction of metabolic processes, intensification of reproductive function, stimulation of embryo-uterine interactions and reduction of pre- and post-implantation losses during pregnancy. The liposomal preparation administered to female rabbits during insemination resulted in an increased number of corpora lutea of pregnancy and an elevated number of implantations, as well as allowed to reduce by half the number of fetus resorptions and to diminish post-implantation losses by 2.3 times, while the use of the preparation 14 days prior to insemination reduced the percentage of pre-implantation loss of fetuses, as compared to similar indices of the control group. A corrective effect of the preparation on the activity of some serum enzymes, the content of structural and reserve lipids, metabolism intensity, as well as on the maintenance of antioxidant-prooxidant balance in reproductive organs improving fertilization and rabbits embryo implantation, was found in female rabbits in the early period of pregnancy.

Key words: cytotoxicity, biocompatibility, cell, embryonic mortality, female rats, female rabbits

Підписано до друку 19.09.2019. Формат 60х84/16
Гарн. Times New Roman. Папір офсетний № 1.
Ум. друк. арк. 2,33.
Зам. № 19/09. Наклад 100 прим.

Друк ФОП Корпан Б.І.
Львівська обл., Пустомитівський р-н., с Давидів, вул. Чорновола 18
Ел. пошта: bkorpan@ukr.net, тел. (093) 480-6141
Код ІНДРФО 1948318017, Свідоцтво фізичної особи-підприємця:
В02 № 635667 від 13.09.2007